

KALZIUMSIGNALLE IN SPERMIEN

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Marzeline Geitner, geb. Tiepner
geboren am 13.04.1990 in Berlin

Gutachter:

1. Prof. Dr. Jürgen Weiss, Luzern Schweiz
2. Prof. Dr. Christoph Biskup, Jena
3. Prof. Dr. Katharina Hancke, Ulm

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.06.2016

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	II
Abkürzungsverzeichnis	V
Zusammenfassung.....	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Bedeutung von Infertilität und Methoden assistierter Reproduktion	3
1.2 Aufbau des Spermiums und Physiologie der Fertilisation	4
1.3 Kalziumsignale in Spermien	9
1.4 Fura-2 als Kalziumindikator	9
1.5 Catsper-Kanal	11
1.6 Bedeutung der Morphologie eines Spermiums	13
1.7 Progesteron und Kalziumsignale	14
1.8 Ulipristal	17
2 Ziele der Arbeit	20
3 Material und Methoden	21
3.1 Samenproben.....	21
3.2 Spermienaufbereitung	21
3.3 Swim-up	21
3.4 Probenaufbereitung für das Kalzium-Imaging.....	22
3.5 Kalzium-Imaging mit Fura-2-AM.....	23
3.5.1 Versuchsaufbau	23
3.5.2 Anfärben und Messen am Mikroskop.....	25
3.6 Durchgeführte Versuche.....	25
3.7 Datenanalyse	27
3.8 Statistische Analyse	30

3.9	Morphologiebeurteilung	30
4	Ergebnisse	32
4.1	Patientendaten	32
4.2	Einteilung in Reaktionsmuster	32
4.3	Progesteronstimulation	35
4.4	Morphologie und Kalziumsignal	36
4.5	Wiederholte Progesteronstimulation	39
4.6	Untersuchungen zur Wirkung von Ulipristal	41
4.6.1	Dosisfindung	41
4.6.2	Ulipristalstimulation und Kalziumsignale	41
4.6.3	Progesteronsignal nach vorangehender Ulipristalstimulation	43
4.6.4	Simultane Stimulation mit Ulipristal und Progesteron	47
5	Diskussion	49
5.1	Kategorien der Reaktionsmuster	49
5.2	Korrelation von Morphologie und Kalziumsignalen	50
5.2.1	Morphologie und Kalzium	50
5.2.2	Morphologie und Spermienfunktionen	52
5.2.3	Zusammenfassung	53
5.3	Ulipristal und Kalziumsignale	53
5.3.1	Ulipristal und Kalzium	53
5.3.2	Ulipristal und Progesteron	55
5.3.3	Ulipristal und Spermienfunktionen	57
5.3.4	Zusammenfassung	57
5.4	Grenzen der Arbeit	58
6	Schlussfolgerungen	60
	Literaturverzeichnis	62
	Abbildungsverzeichnis	66

Tabellenverzeichnis.....	67
Ehrenwörtliche Erklärung	68
Danksagung	69

Abkürzungsverzeichnis

AM	Acetoxymethylester
ART	Assisted reproductive technology
BSA	Bovine serum albumin
Catsper	Cationic channel of sperm
CNG	Cyclic nucleotid gated
DNA	Desoxyribonucleinsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HSA	Humanes Serumalbumin
HTFM	Human Tubal Fluid Medium
ICSI	Intracytoplasmatic sperm injection
IMSI	Intracytoplasmatic morphologically selected sperm injection
IUI	Intrauterine Insemination
IVF	In-Vitro Fertilisation
IVFM	In-Vitro-Fertilisationsmedium
MW	Mittelwert
RNE	Redundant nuclear envelope
ROS	Reactive oxygen species
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SPM	Sperm Preparation Medium
SPRM	Selektive Progesteronrezeptormodulatoren
TRP	Transient receptor potential
UPA	Ulipristalacetat
WHO	World Health Organisation

Zusammenfassung

Weltweit ist in etwa eins von sieben Paaren ungewollt kinderlos. Vor diesem Hintergrund ist die Spermienforschung von großer gesellschaftlicher Relevanz um zukünftig eine effektivere Diagnostik und Therapie zu ermöglichen. Viele für die Befruchtung wichtige Spermienfunktionen sind Kalzium-vermittelt. Somit sind Kalziumsignale geeignete Parameter, um Auswirkungen auf Spermienfunktionen einschätzen zu können. Anhand von Kalziumsignalen sollen in dieser Arbeit daher die Bedeutung der Spermienmorphologie und die Effekte des in der präoperativen Myomtherapie eingesetzten Ulipristals auf Spermien untersucht und beurteilt werden. Dazu wurde der Kalziumindikator Fura-2-AM verwendet und Änderungen der Kalziumionenkonzentration an einem inversen Epifluoreszenzmikroskop verfolgt.

Die Morphologie gehört neben der Motilität und der Konzentration zu den drei wichtigsten weltweit etablierten Kriterien zur Beurteilung von Spermien. Allerdings ist ihre Bedeutung zunehmend umstritten. Daher untersucht der erste Teil der Arbeit den Effekt der Morphologie auf den physiologisch relevanten Progesteron-induzierten Kalziumeinstrom, indem es die Kalziumsignale morphologisch normaler und abnormaler Spermien vergleicht. In den durchgeführten Messungen wurde kein statistisch signifikanter Unterschied der Kalziumeinströme zwischen den beiden Gruppen gefunden. So kann angenommen werden, dass der potentielle Einfluss der Morphologie auf die Fertilität nicht über die Progesteron-induzierte Kalziumstimulation vermittelt wird und daher viele wichtige Spermienfunktionen nicht von der Morphologie abhängen.

Der Progesteronrezeptormodulator Ulipristal ist seit 2012 zur Therapie des Uterus myomatosus zugelassen. Somit ist es möglich, dass Spermien mit diesem Wirkstoff im weiblichen Genitaltrakt in Berührung kommen. Daher wurde im zweiten Teil der Arbeit geprüft, ob Ulipristal auf den nicht-genomischen Progesteronrezeptor humaner Spermien wirkt und somit wie Progesteron die intrazelluläre Kalziumionenkonzentration beeinflusst. Bei Zugabe einer 20 μM Ulipristal-Lösung wurden Kalziumeinströme beobachtet, die vergleichbar mit solchen nach Progesteronstimulation waren. Niedrigere Konzentrationen (5, 10, 15 μM) zeigten diesen Effekt nicht. Weitere Untersu-

chungen mit Ulipristal und Progesteron erfolgten, um eine Interaktion beider Substanzen zu beurteilen. Hierbei konnte bei gleichzeitiger Zugabe der Substanzen keine Veränderung des Progesteron-induzierten Kalziumeinstroms nachgewiesen werden, während eine vorangehende Ulipristalgabe einen hemmenden Effekt auf den nachfolgenden Progesteron-induzierten Kalziumanstieg hatte. Insgesamt konnten bei Stimulation mit einer Konzentration von 20 μM Ulipristal eine Induktion von Kalziumsignalen nachgewiesen werden, die ähnliche Eigenschaften wie die Signale nach Stimulation mit Progesteron zeigten.

1 Einleitung

1.1 Bedeutung von Infertilität und Methoden assistierter Reproduktion

Weltweit sind annähernd 80 Millionen Paare ungewollt kinderlos (Boivin et al. 2007, Barratt et al. 2010). In der Hälfte der Fälle sind männliche Faktoren beteiligt, dabei spielen zum Beispiel genetische Ursachen, aber auch Umwelttoxine, neoplastische und endokrinologische Erkrankungen eine Rolle (Hildebrand et al. 2010). In den meisten Fällen gibt es keine effektive Behandlung der männlichen Infertilität, die einzige Option ist meist die künstliche Befruchtung (Publicover et al. 2007). Da die Inzidenz der männlichen Subfertilität weiter zunimmt (Skakkebaek et al. 2001), ist die Spermienforschung von großer klinischer Relevanz um zur Geburt eines gesunden Kindes beizutragen.

Am Anfang einer Kinderwunschbehandlung steht die Beurteilung der Qualität des Ejakulats. Dieses sogenannte Spermogramm erfasst wichtige Samenparameter und trägt zur Entscheidung über Therapiemöglichkeiten bei (Tabelle 1).

Tabelle 1: Referenzwerte des normalen Spermogramms gemäß der WHO (WHO 2010)

Parameter	Referenzwert der WHO
pH	$\geq 7,2$
Volumen	$\geq 1,5$ ml
Konzentration	$\geq 15 \times 10^6$ / ml
Gesamtmotilität	$A + B + C \geq 40$ %*
Progressive Motilität	$A+B \geq 32$ %*
Morphologie	≥ 4 %

*A: schnell fortschreitende Motilität; B: fortschreitende Motilität; C: stationäre Motilität

Mithilfe der von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) veröffentlichten Referenzwerte lassen sich die Samenproben klassifizieren. Dabei bezeichnet die Normozoospermie einen Normalbefund gemäß der in Tabelle 1 genannten Referenzwerte. In Abhängigkeit der abweichenden Werte kann man die Oligozoospermie (reduzierte Konzentration), die Asthenozoospermie (reduzierte Beweglichkeit), die Teratozoospermie (verminderter Anteil morphologisch normaler Spermien), die Azoospermie (keine Spermien im Ejakulat) und Kombinationen der betroffenen Parameter unterscheiden (Nieschlag und Bongers 2012).

Bei pathologischen Befunden kommen Methoden der künstlichen Befruchtung in Betracht, die die Fertilisation unterstützen können. Voraussetzung dafür ist zumindest eine Spermienzelle, die fähig ist, eine Eizelle zu befruchten. Das Ausmaß des Befundes und zusätzliche weibliche Pathologien entscheiden über die Auswahl der Methode. Als Therapie der ersten Wahl kommt häufig eine intrauterine Insemination (IUI) der Spermien in Betracht, da sie kostengünstiger und weniger invasiv als die anderen Methoden ist (Nieschlag et al. 2009). Bei schwereren Einschränkungen der Spermienqualität oder Misserfolgen vorangegangener Behandlungen, aber natürlich auch bei eileiterbedingter weiblicher Infertilität sollte eine In-vitro Fertilisation (IVF) empfohlen werden (Nieschlag et al. 2009). Seit 1992 wird die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) durchgeführt (Palermo et al. 1992), die auch bei Männern mit minimaler Spermienproduktion das Entstehen einer Schwangerschaft ermöglichen kann. Konventionelle Qualitätsmerkmale von Spermien wie Motilität oder Konzentration verlieren angesichts der Möglichkeiten der ICSI zunehmend an Bedeutung (Nieschlag et al. 2009). Eine Sonderform der ICSI stellt die morphologisch selektierte Spermieninjektion (IMSI) dar, bei der mit 6000-facher Vergrößerung ein möglichst normal aussehendes Spermium zur Injektion in die Eizelle ausgewählt wird (Bartoov et al. 2003).

1.2 Aufbau des Spermiums und Physiologie der Fertilisation

Die Spermienzelle ist eine kleine, polare und bewegliche Zelle, der die meisten Organellen fehlen und die durch ihre extrem kondensierte DNA nicht mehr zu Prozessen wie Transkription und Translation in der Lage ist (Barratt und Publicover 2012). Der Kopf des Spermiums enthält neben dem im Zellkern kondensierten Erbgut noch

das Akrosom und das Residualkörperchen (redundant nuclear envelope, RNE). Das Akrosom ist eine durch eine einfache Membran begrenzte, spezialisierte Organelle, die dem Zellkern anliegt (Darszon et al. 2011). Das RNE im Hals des Spermiums entsteht aus der überschüssigen Kernhülle während der Chromatinkondensation und dient vermutlich als intrazellulärer Kalziumspeicher (Ho und Suarez 2003). Die Flagelle des Spermiums besteht aus einem besonders langen Kinozilium, welches durch Interaktion seines charakteristischen Mikrotubuligerüsts und der zugehörigen Motorproteine eine oszillierende Bewegung ermöglicht (Nieschlag et al. 2009, Aumüller 2007). Die dazu benötigte Energie liefern die Mitochondrien im Mittelstück (Nieschlag et al. 2009) (Abbildung 1).

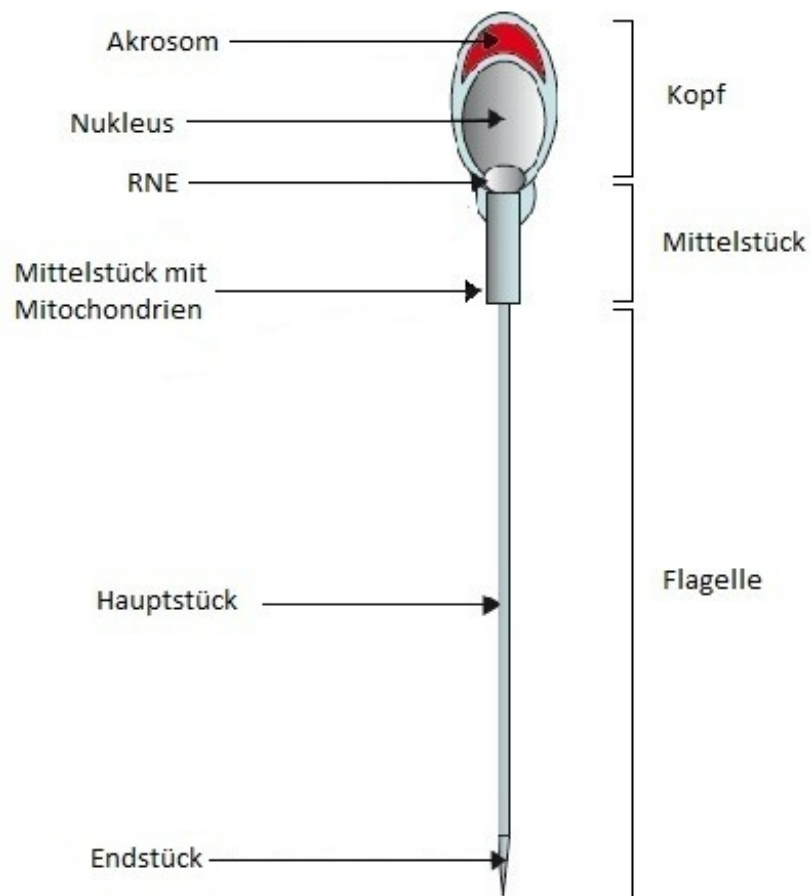


Abbildung 1: Aufbau eines Spermiums. Der Kopf enthält neben dem Erbgut im Zellkern das Akrosom zum Penetrieren der Eihülle und das RNE. Die Flagelle besteht aus Haupt- und Endstück des Schwanzes. Die Mitochondrien im Mittelstück liefern die Energie für die Bewegung des Schwanzes. Bild adaptiert übernommen von Publicover et al. (Publicover et al. 2007).

Um eine Eizelle zu befruchten, muss das Spermium den weiblichen Genitaltrakt durchqueren (Publicover et al. 2007). Das Ziel des Spermiums ist dabei der Transport des Erbguts zur weiblichen Gamete, daher ist die Motilität eine der wichtigsten Spermienfunktionen (Darszon et al. 2011). Mit der Ejakulation werden die Spermien motil, die Flagelle dient dabei als treibende Kraft (Darszon et al. 2011). Man unterscheidet die „aktivierte“ Beweglichkeit, die sich durch einen symmetrischen Flagel-

lenschlag und eine vorwärts gerichtete, progressive Bewegung auszeichnet, von der „hyperaktivierten“ Beweglichkeit (Qi et al. 2007, Darszon et al. 2011). Diese ist gekennzeichnet durch einen kraftvollen, asymmetrischen Flagellenschlag mit großer Amplitude und großer Krümmung (Darszon et al. 2011, Qi et al. 2007, Muratori et al. 2009). Die Hyperaktivierung dient dem progressiven Schwimmen im hoch-viskosen Cervixschleim, der Penetration der Eihülle sowie dem Ablösen vom Spermienreservoir im Isthmus des Eileiters (Darszon et al. 2011, Muratori et al. 2009).

Das Auffinden der Eizelle durch die Samenzelle wird über verschiedene Reize gesteuert (Eisenbach und Giojalas 2006). Durch Substanzen, die von der Eizelle und den umgebenden Cumuluszellen freigesetzt werden, werden die Spermien chemotaktisch angelockt (Baldi et al. 2009). Auch die Temperatur spielt für die Steuerung humaner Spermien eine Rolle. Die Spermien bewegen sich entlang eines Temperaturgradienten (Darszon et al. 2011). Die Ampulla hat eine höhere Temperatur als der Isthmus des Eileiters, was für die gerichtete Bewegung der Spermien über lange Strecken verantwortlich sein könnte (Nieschlag et al. 2009).

Während der Migration durch den weiblichen Genitaltrakt müssen sich die Spermien strukturellen und funktionellen Veränderungen unterziehen, um die Kompetenz zu erlangen, die Eizelle befruchten zu können. Diesen Vorgang, der auch als Kapazitation bezeichnet wird, regulieren Zellen und Flüssigkeiten des weiblichen Genitaltrakts (Suarez und Pacey 2006). In vitro kann dieser Prozess durch Inkubation in einem definierten Kapazitationsmedium nachgebildet werden. Dieses enthält Bikarbonat, Kalziumionen und Albumin (Xia und Ren 2009).

Wenn das Spermium die Eizelle erreicht, muss es zunächst die umgebende Cumulusmasse penetrieren. Durch Bindung an die Zona pellucida der Gamete wird im Spermium die Akrosomreaktion induziert. Es kommt zur irreversiblen Exozytose des Akrosominhalts (Wassarman et al. 2001). Die freigesetzten Enzyme ermöglichen dem Spermium die Penetration der Eihülle (Darszon et al. 2011). Die Fertilisation endet mit dem Verschmelzen des Spermiums mit der Plasmamembran der Eizelle (Wassarman et al. 2001) (Abbildung 2).

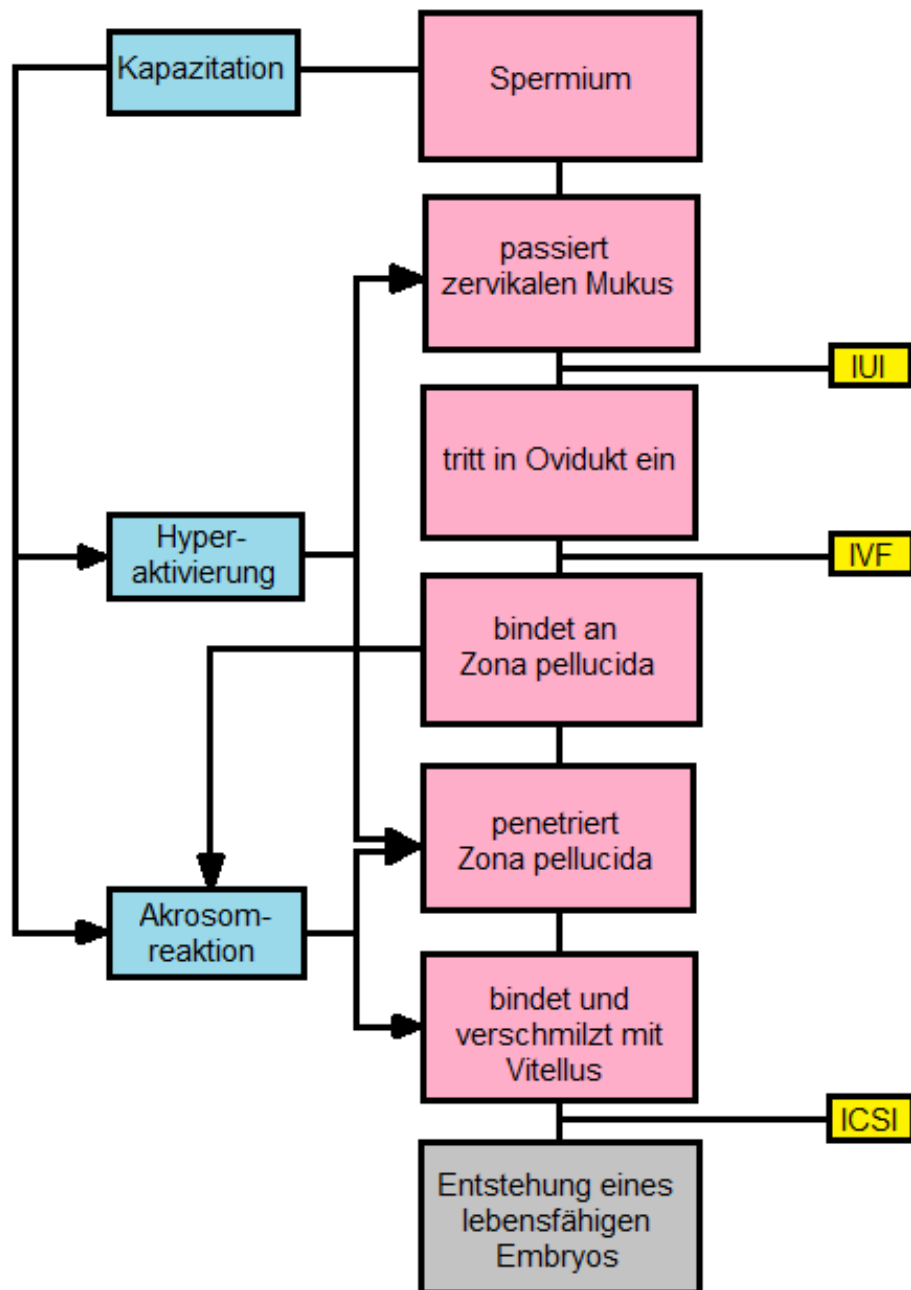


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Prozesse im weiblichen Genitaltrakt. Rosa hinterlegt: aufeinander folgende Ereignisse auf dem Weg eines potentiell befruchtungsfähigen Spermiums. Blau hinterlegt: gleichzeitig ablaufende Kapazitationsprozesse im Spermium. IUI, IVF, ICSI: Ansatzpunkte der intrauterinen Insemination, der In-Vitro-Fertilisation und der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion. Bild adaptiert übernommen von Nieschlag et al. (Nieschlag et al. 2009).

1.3 Kalziumsignale in Spermien

Wie bei vielen anderen physiologischen Prozessen, beispielsweise der Exozytose oder der Muskelkontraktion (Paredes et al. 2008), hat Kalzium auch im Spermium die Funktion eines intrazellulären Botenstoffes. Die Kalziumionen regulieren die Akrosomreaktion, den Modus des Flagellenschlags inklusive der Hyperaktivierung sowie der Chemotaxis und haben eine wichtige Rolle beim Prozess der Kapazitation (Harper et al. 2004, Ren und Xia 2010). Die dafür benötigten Kalziumionen stammen einerseits aus dem Extrazellularraum, andererseits aus den intrazellulären Kalziumspeichern des Akrosoms und des RNE (Ren und Xia 2010).

Im Spermium wurden bisher vier verschiedene Typen von Kalziumkanälen entdeckt: Catsper-Kanäle, CNG-Kanäle, spannungsabhängige Kalziumkanäle und TRP-Kanäle (Darszon et al. 2011, Ren und Xia 2010). Von den beschriebenen Kalziumkanälen konnte bisher nur für den Catsper-Kanal gezeigt werden, dass er für die Fertilisation benötigt wird (Brenker et al. 2012).

1.4 Fura-2 als Kalziumindikator

Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 ist ein ratiometrischer Kalziumindikator (Paredes et al. 2008). Mit zunehmender Kalziumionenkonzentration verschiebt sich das Anregungsmaximum ins energiereichere, kurzwelligere Spektrum (Abbildung 3) (Hayashi und Miyata 1994). Unterhalb der Wellenlänge des isosbestischen Punktes bei ~360 nm nimmt die Fluoreszenz mit steigender Kalziumionenkonzentration zu, während sie bei einer Anregung oberhalb von 360 nm abnimmt. Indem man das Verhältnis aus den Intensitäten bildet, die oberhalb und unterhalb dieses Punktes gemessen werden, entsteht eine Größe, die nur von der Kalziumionenkonzentration, nicht aber von der Konzentration des Indikators, der Zelldicke oder der Anregungsintensität abhängt (Hayashi und Miyata 1994). Nicht-ratiometrische Indikatoren, die keine Verschiebung des Anregungsspektrums zeigen, bieten diesen Vorteil nicht.

Üblicherweise erfolgt die Anregung bei den Wellenlängen 340 und 380 nm, während die Emission im Bereich von 470 - 550 nm gemessen wird. Aus den Messwerten lässt sich nach einer entsprechenden Kalibrierung die Kalziumionenkonzentration bestimmen (Grynkiewicz et al. 1985).

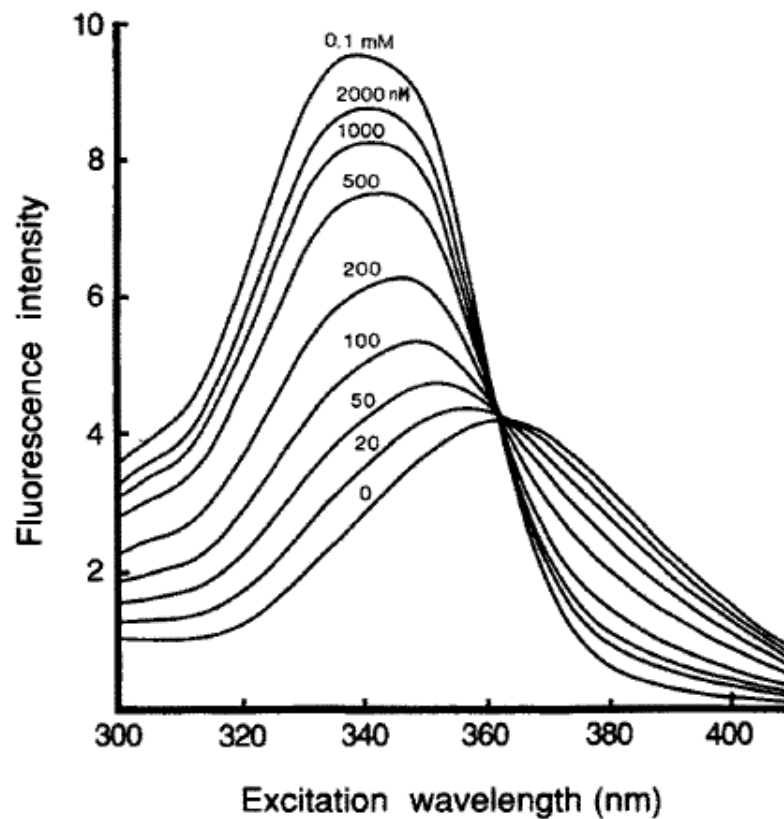


Abbildung 3: Anregungsspektrum von Fura-2 bei verschiedenen Kalziumionenkonzentrationen. Eine ansteigende Konzentration verschiebt das Absorptionsmaximum des Farbstoffs zu kürzeren Wellenlängen. Bild übernommen von Hayashi et al. (Hayashi und Miyata 1994)

Um die Zelle mit dem wasserlöslichen und für die Zellmembran impermeablen Indikator zu beladen, wird meist der Acetoxymethylester des Farbstoffes (Fura-2-AM) eingesetzt. Dieser kann aufgrund seiner größeren Lipidlöslichkeit die Zellmembran besser passieren und wird im Zytosol des Spermiums durch intrazelluläre Esterasen zur aktiven Form des Farbstoffes hydrolysiert (Paredes et al. 2008). Aufgrund der so demaskierten Carboxygruppen, die bei zellulären pH-Wert in deprotonierter Form vorliegen, akkumuliert der Farbstoff in der Zelle.

1.5 Catsper-Kanal

Der Catsper-Kanal ist ein spermispezifischer Kationenkanal, der im Hauptstück des Spermischwanzes lokalisiert ist (Darszon et al. 2011, Kirichok et al. 2006, Lishko et al. 2011). Vier porenformende α -Untereinheiten (Catsper 1-4) bilden als Heterotetramer die Grundstruktur des Kanals. Drei weitere Hilfsuntereinheiten (Catsper β , γ , δ) haben große extrazelluläre Domänen und dienen möglicherweise der extrazellulären Regulation des Kanals (Abbildung 4). Für einen funktionstüchtigen Kanal und eine damit verbundene erfolgreiche Fertilisation sind vermutlich alle vier Catsper-Untereinheiten essentiell (Darszon et al. 2011).

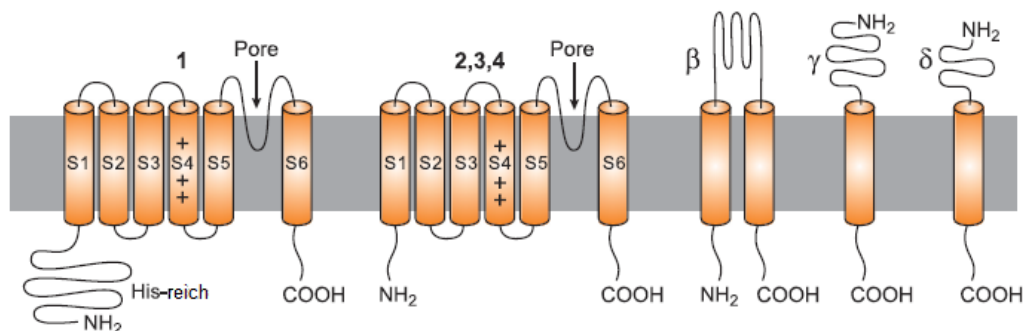


Abbildung 4: Struktur des Catsper-Kanals. *Links:* Proteintopologie der α -Untereinheit Catsper 1, mit sechs Transmembransegmenten und einer zyttoplasmatischen Histidin-reichen Domäne; *Mitte:* α -Untereinheiten Catsper 2-4, ähnlicher Aufbau wie Catsper 1, aber kürzere zyttoplasmatischen Enden; *Rechts:* Topologie der Hilfsuntereinheiten Catsper β , γ und δ mit großen extrazellulären Domänen. Bild adaptiert übernommen von Darszon et. al (Darszon et al. 2011).

Untersuchungen an Knock-out-Mäusen, denen eine der Catsper-Isoformen fehlt, haben gezeigt, dass diese infertil sind (Qi et al. 2007). Im Einklang dazu konnten bei humanen Spermien Catsper 1- und 2-Mutationen mit männlicher Infertilität und auffälligen Spermiogrammbefunden assoziiert werden (Hildebrand et al. 2010, Ren und Xia 2010). Diese Mutationen betreffen vor allem die Spermienphysiologie und weniger die Spermatogenese und Spermiogenese (Ren und Xia 2010). Da der Catsper-Kanal essentiell für Spermienfunktionen und männliche Fertilität ist, könnte er in Zukunft auch Zielstruktur bei der Kontrazeption werden (Singh und Rajender 2014).

Unter physiologischen Bedingungen ist der Kanal selektiv permeabel für Kalziumionen, aber im Calcium-freien Medium ist er auch für einwertige Ionen (Na^+ , Cs^+) durchlässig (Kirichok et al. 2006, Lishko et al. 2011).

Im Spermium führt die Aktivierung des Kanals durch verschiedene Mechanismen zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumionenkonzentration (Ren und Xia 2010). Dieser Anstieg beginnt im Hauptstück des Schwanzes, breitet sich aber bis in den Kopf aus (Xia et al. 2007). Der durch den Catsper-Kanal vermittelte Kalziumioneneinstrom ist vermutlich an vielen physiologischen Spermienfunktionen beteiligt, wie der Hyperaktivierung (Darszon et al. 2011, Strünker et al. 2011), der Chemotaxis (Strünker et al. 2011, Lishko et al. 2011) und der Akrosomreaktion (Lishko et al. 2011).

Die Regulation des Kanals ist komplex und erfolgt über den pH-Wert, das elektrische Potential und verschiedene Liganden (Singh und Rajender 2014). Zu den Liganden, die den Catsper-Kanal stimulieren, zählen Progesteron und Prostaglandine (Strünker et al. 2011, Lishko et al. 2011), aber auch BSA, Zona-Pellucida-Glykoproteine und zyklische Nukleotide (Ren und Xia 2010). Auch Geruchsstoffe wie Burgeonal aktivieren den Kanal, obwohl diese Gegebenheit ohne physiologische Relevanz ist (Brenker et al. 2012). Insgesamt wirken polymodale Stimuli aus der Umgebung auf den Catsper-Kanal ein, die in verschiedene Kalziummobilisationsmuster übersetzt werden. Der Kanal hat daher eine Schlüsselrolle bei der Navigation der Spermien zur Eizelle (Brenker et al. 2012).

1.6 Bedeutung der Morphologie eines Spermiums

Die Bewertung der Morphologie wird als Bestandteil der Spermienanalyse bei der Infertilitätsdiagnostik durchgeführt (French et al. 2010). Eine Spermienzelle wird als strukturell gesund angesehen, wenn sie weder Kopf-, Mittelstück- noch Schwanzdefekte aufweist (Dittrich et al. 2005). Im Laufe der Zeit wurde der Referenzwert der WHO für die Morphologie eines Ejakulats immer weiter herabgesetzt. Mussten 1992 noch mindestens 30% der Zellen normal geformt sein (WHO 1992), waren es 1999 nur noch 14% (WHO 1999). Laut der neuen 5. Auflage des WHO-Laborhandbuches sind derzeit sogar 4 % normal aussehende Spermien genügend (WHO 2010).

Die Bedeutung der Morphologieanalyse wird in der Literatur kontrovers diskutiert (French et al. 2010, Keegan et al. 2007) und widersprüchliche Ergebnisse wurden in den vergangenen Jahren publiziert (Demir et al. 2012).

So wurde von Kruger et al. 1986 zuerst postuliert, dass die Klassifikation von Spermien nach strikten Morphologiekriterien sinnvoll für die Vorhersage des Fertilisationserfolgs sei (Kruger et al. 1986). In Anlehnung daran gibt es viele weitere Publikationen, die einen Zusammenhang zwischen Morphologie und Fertilitätspotential annehmen (Kihale et al. 2003, Kruger et al. 1988, Lundin et al. 1997, Osawa et al. 1999). Eine Metaanalyse auf der Basis von 49 Studien, die den Einfluss der Spermienmorphologie hinsichtlich der IVF-Erfolge untersucht haben, folgte, dass die Morphologiebestimmung ein wertvolles diagnostisches Werkzeug in der Bewertung männlicher Infertilität sei (Kruger und Coetzee 1999). Die morphologisch selektierte Spermieninjektion solle einen Vorteil gegenüber einer konventionellen ICSI haben (Bartoov et al. 2003).

Im Gegensatz dazu stehen einige neuere Publikationen, in denen der Einfluss der Morphologie auf den Erfolg von ICSI- und IVF-Zyklen in Frage gestellt und postuliert wurde, dass Patienten mit auffälliger Spermienmorphologie sowohl in den Fertilitäts- als auch Schwangerschafts- und Lebendgeburtenraten vergleichbare Ergebnisse wie die Kontrollgruppen erzielen (Demir et al. 2012, French et al. 2010, Ghirelli-Filho et al. 2012, Keegan et al. 2007). Desweiteren zeigte eine multizentrische randomisierte Studie, dass eine morphologische Spermien Selektion vor intrazytoplasmatischer Injektion (IMSI) keine besseren Ergebnisse im Vergleich zur klassischen ICSI erzielen konnte (Leandri et al. 2013).

Morphologische Defekte sind sehr variabel und nehmen nicht unbedingt Einfluss auf die Physiologie des Spermiums. Die eigentliche Aufgabe eines Spermiums ist der Transport des Erbguts. Inwieweit strukturelle Zellauffälligkeiten mit Defekten im Erbgut korrelieren, ist nicht abschließend geklärt und eine abnormale Morphologie ist daher nicht automatisch mit einem Chromosomenschaden verbunden (Franken und Oehninger 2012, French et al. 2010). Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Morphologie bedeutend für spezielle Spermienfunktionen, insbesondere die Induktion der Akrosomreaktion, ist (Liu und Baker 1992). Außerdem wird vermutet, dass Spermien mit schlechter Morphologie besonders viele reaktive Sauerstoffspezies (ROS) generieren und damit ihre eigene DNA schädigen (Aziz et al. 2004).

Bislang konnte die Bedeutung der Morphologie nicht ausreichend geklärt werden. Es gibt aber einige Hinweise darauf, dass die Bestimmung der Spermienmorphologie im Rahmen der künstlichen Befruchtung, vor allem bei Anwendung der ICSI-Technik nur eine untergeordnete Rolle spielt (Demir et al. 2012, Ghirelli-Filho et al. 2012, Keegan et al. 2007).

1.7 Progesteron und Kalziumsignale

Das C_{21} -Steroidhormon Progesteron ist der wichtigste Vertreter der Gestagene und gilt als potenter Stimulator menschlicher Spermien (Abbildung 5) (Lishko et al. 2011). Es wird von den Granulosazellen des Cumulus oophorus im weiblichen Genitaltrakt gebildet und erreicht dort vermutlich mikromolare Konzentrationen (Sagare-Patil et al. 2012). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass das Ansprechen der Spermien auf Progesteron signifikant mit dem Fertilitätsvermögen des Mannes korreliert (Falsetti et al. 1993, Krausz et al. 1996). Progesteron spielt daher eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von Spermien.

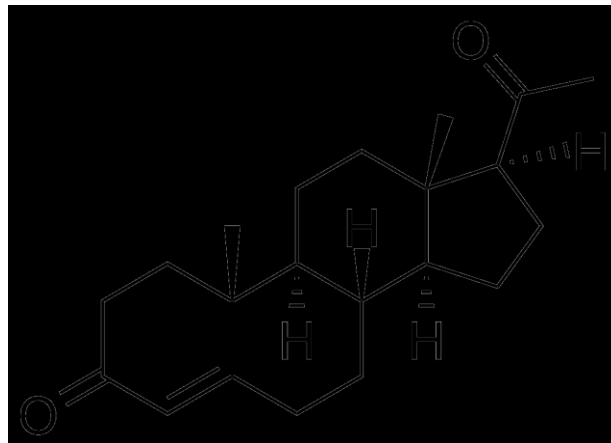


Abbildung 5: Strukturformel von Progesteron. Mit seiner C₂₁-Struktur ist Progesteron der wichtigste Vertreter der Gestagene.

Diese durch Progesteron induzierte Stimulation wird über den Catsper-Kanal vermittelt (Lishko et al. 2011, Strünker et al. 2011). Die Kanal wird nicht-genomisch aktiviert, entweder durch Bindung an den Kanal selbst oder an ein assoziiertes Protein (Strünker et al. 2011). Das entstehende Kalziumsignal ist biphasisch: Dem rapiden, transienten Kalziumanstieg, der von der extrazellulären Kalziumionenkonzentration abhängig ist, folgt eine langsamere, andauernde Anhebung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration (Strünker et al. 2011, Kirkman-Brown et al. 2000) (Abbildung 6). Der schnelle Kalziumeinstrom wird über den Catsper-Kanal vermittelt, während bei der folgenden Kalziumelevation noch unklar ist, ob diese durch einen extrazellulären Kalziumeinstrom oder durch eine Kalzium-gesteuerte Kalziumfreisetzung aus den intrazellulären Kalziumspeichern (Akrosom und RNE) entsteht (Strünker et al. 2011).

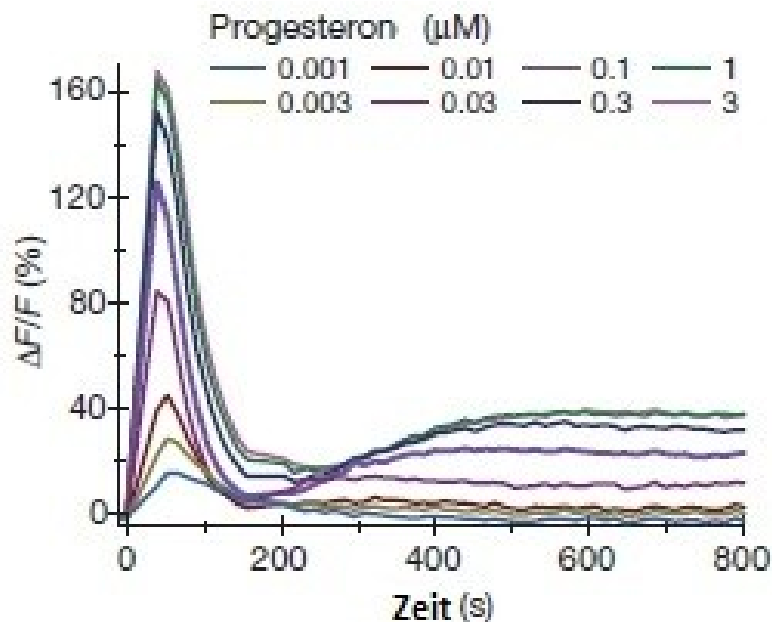


Abbildung 6: Biphasischer Kalziumeinstrom nach Progesteronstimulation. Bild adaptiert übernommen von Strünker et al. (Strünker et al. 2011)

Der Progesteron-induzierte Kalziumeinstrom in das Spermium verursacht multiple physiologische Antworten, die essentiell für eine erfolgreiche Fertilisation sind (Lishko et al. 2011). So konnte gezeigt werden, dass Progesteron in vitro die Hyperaktivität der Flagelle, Chemotaxis und Akrosomreaktion in humanen Spermien stimulieren kann (Baldi et al. 2009). Verschiedene Präsentationsformen von Progesteron verursachen verschiedene Muster der Kalziummobilisierung und führen zu unterschiedlichen zellulären Antworten (Bedu-Addo et al. 2007). So induzieren höhere Konzentrationen von Progesteron (1-10 μM), wie sie um die ovulierte Eizelle auftreten (Correia et al. 2007), den hyperaktivierten Flagellenschlag sowie die Akrosomreaktion (Sagare-Patil et al. 2012). Im Gegensatz dazu führen nanomolare Konzentrationen des Gestagens, wie sie durch Diffusion möglicherweise am distalen Ende des weiblichen Genitaltrakts vorkommen (Sagare-Patil et al. 2012), zu einer Modulation des Flagellenschlags (Harper et al. 2004, Bedu-Addo et al. 2007) und zu einer Änderung der Orientierung im Raum entsprechend des Mechanismus der

Chemotaxis (Teves et al. 2009). Physiologisch relevant ist dabei vermutlich ein Progesterongradient mit ansteigenden Konzentrationen in Richtung Eizelle (Harper et al. 2004). Dieser führt zu einem langsamen Anstieg des intrazellulären Kalziums verbunden mit überlagerten Oszillationen der Kalziumionenkonzentration (Harper et al. 2004). Insgesamt sind die verschiedenen Kalziumsignale, die sich nach Progesteronstimulation zeigen komplex und noch nicht vollständig verstanden. (Li et al. 2014b)

1.8 Ulipristal

Ulipristal ist strukturell eng verwandt mit dem Gestagen Progesteron und gehört zu den selektiven Progesteronrezeptormodulatoren (SPRM). Diese synthetisch hergestellten Substanzen haben ein breites Wirkungsspektrum, das sowohl antagonistische als auch agonistische Effekte am Progesteronrezeptor beinhalten kann (Abbildung 7) (Munuce et al. 2012). Derzeit kommt der Wirkstoff als Notfallkontrazeptivum zur Anwendung (Wilton 2012, Chabbert-Buffet et al. 2012). Zudem wurde es kürzlich als Medikament in der präoperativen Myomtherapie zugelassen, da es verstärkt zur Apoptose der Myomzellen führt (Horak et al. 2012) und die Neovaskularisation und Zellproliferation hemmt (Singh und Belland 2015).

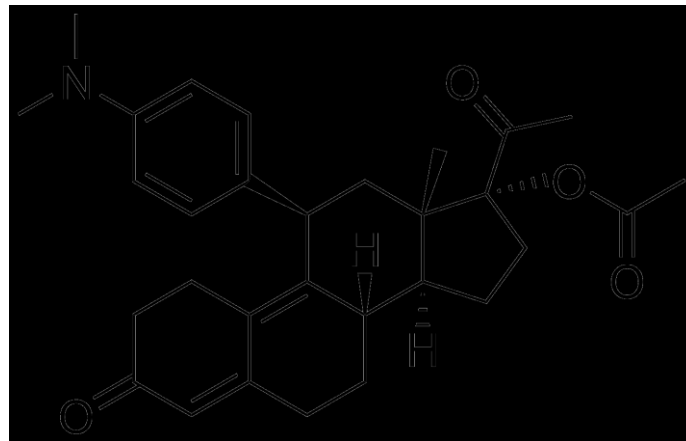


Abbildung 7: Strukturformel von Ulipristalacetat. UPA ist strukturell eng verwandt mit dem natürlichen Progesteron und wird synthetisch hergestellt.

Durch die Einnahme von Ulipristal könnten Spermien im weiblichen Genitaltrakt mit diesem SPRM in Kontakt kommen (Munuce et al. 2012), daher ist es klinisch von großer Relevanz, den Effekt von Ulipristal auf Spermien beurteilen zu können.

Eine Studie, die den Effekt von Ulipristal bei Rattenspermien untersuchte, konnte keine Veränderungen der Spermienkonzentration, Beweglichkeit, Spermatogenese und des Fertilisationsvermögens feststellen (Wang et al. 1995). Munuce et al. untersuchten Funktionen humaner Spermien nach Inkubation mit Ulipristalacetat (UPA). In den verwendeten Konzentrationen (1-10.000 ng / ml) konnten allerdings keine Veränderungen der Vitalität, der Induktion der Akrosomreaktion und der an der Kapazitation beteiligten Proteintyrosinphosphorylierung festgestellt werden (Munuce et al. 2012). Da Progesteron den Catsper-Kanal über einen nicht-genomischen Mechanismus stimuliert (Lishko et al. 2011, Strünker et al. 2011), könnte Ulipristal als Progesteronrezeptormodulator diesen Kanal ebenfalls stimulieren oder den Progesteron-vermittelten Kalziumioneneinstrom beeinflussen. Dies wurde partiell in einer aktuellen Studie überprüft. Hierbei zeigte sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der Progesteron-induzierten Akrosomreaktion, Hyperaktivität und intrazellulären Kalziumionenkonzentration. Für UPA alleine konnte jedoch keinen Einfluss auf

die intrazelluläre Kalziumionenkonzentration festgestellt werden (Ko et al. 2014). Auch für ein anderes Präparat aus der Gruppe der SPRM, das dem Ulipristal ähnliche Mifepriston (Wang et al. 1995), konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass es einen, wenn auch kleinen, Effekt auf den Progesteron-induzierten Kalziumeinstrom hat (Jang und Yi 2002, Serres et al. 1994, Yang et al. 1994, Ko et al. 2014).

2 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit sollen Kalziumsignale humaner Spermien und ihre Beeinflussung durch verschiedene Parametern untersucht werden. Der Progesteron-induzierte Kalziumeinstrom, der für viele wichtige Spermienfunktionen verantwortlich gemacht wird, soll als Grundlage zur Beurteilung der untersuchten Effekte dienen. Hierzu werden Messungen mit dem Kalziumindikator Fura-2-AM an einem inversen Epifluoreszenzmikroskop durchgeführt.

Die Morphologiebestimmung wird als Bestandteil eines Spermiogramms während einer andrologischen Diagnostik routinemäßig durchgeführt. Allerdings wird die Relevanz der Morphologie in den letzten Jahren zunehmend kontrovers diskutiert. Daher soll in dieser Studie untersucht werden, inwieweit das Aussehen der Zellen mit den gemessenen Veränderungen der Kalziumionenkonzentration korreliert. Dabei soll der Progesteron-induzierte Kalziumeinstrom morphologisch normaler Spermien mit dem morphologisch abnormaler Spermien verglichen werden. Diese Untersuchungen sollen Auskunft darüber geben, ob morphologisch abnormale Spermien zusätzlich zu ihrer auffälligen Erscheinung auch Veränderungen in ihren Kalziumsignalen aufweisen.

Ulipristal wird in der Gynäkologie als Notfallkontrazeptivum und zur Behandlung von Myomen angewendet. Da Spermien mit dieser Substanz im weiblichen Genitaltrakt in Berührung kommen könnten, ist es wichtig die Wirkung von Ulipristal auf Samenzellen abschätzen zu können. Dabei soll untersucht werden, ob Ulipristal wie Progesteron einen Kalziumeinstrom in die Spermien induziert. Des Weiteren soll geprüft werden, ob die Substanz mit dem natürlichen Gestagen Progesteron interagiert und somit den Progesteron-induzierten Kalziumeinstrom beeinflusst. Dazu erfolgen Messungen mit simultaner und sequentieller Zugabe von Progesteron und Ulipristal. Aus den Ergebnissen soll abgeleitet werden, ob Ulipristal ebenfalls an den nicht-genomischen Progesteronrezeptor der Spermien bindet und eine Signalkaskade auslösen kann.

3 Material und Methoden

3.1 Samenproben

Die Proben wurden mittels Masturbation nach mindestens dreitägiger sexueller Karenz gewonnen und in der Frauenklinik des Universitätsklinikums Jena zu diagnostischen Zwecken untersucht. Im Anschluss an die Routinediagnostik erfolgte die Messung der Kalziumsignale. Insgesamt wurden für diese Arbeit Ejakulate von 21 Männern verwendet. Für die Untersuchungen wurden nur Ejakulate mit Normozoospermien gemäß den Referenzwerten der WHO 2010 (Nieschlag und Bongers 2012) benutzt.

3.2 Spermienaufbereitung

Zur Verflüssigung des gewonnenen Ejakulats wurden die Proben für 30 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurde für jede Probe ein Spermogramm erhoben. Dabei wurden routinemäßig die Motilität, die Konzentration, das Ejakulatvolumen und der pH-Wert untersucht. Die Beweglichkeit der Spermien wurde unter einem Durchlichtmikroskop (Zeiss Standard 20, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) gemäß der WHO-Klassifikation in die Kategorien A (schnelle Vorwärtsbewegung), B (langsame Vorwärtsbewegung), C (keine Vorwärtsbewegung) und D (unbeweglich) eingeteilt. Dabei ergibt die Summe der ersten zwei Kategorien die Progressivmotilität und die der ersten drei die Gesamtmotilität der Probe. Die Bestimmung der Zellkonzentration erfolgte mikroskopisch mittels einer Neubauer-improved Zählkammer. Außerdem wurden auch Ejakulatvolumen mittels einer 5 ml Spritze und der pH-Wert mittels pH-Papiers ermittelt.

3.3 Swim-up

Für das Kalzium-Imaging wurden ausschließlich mithilfe der Swim-up-Technik aufbereitete Spermien verwendet. Bei diesem Verfahren nutzt man die Schwimffähigkeit der Spermien, um vitale, motile Spermienzellen vom Seminalplasma, anderen enthaltenen Zellen oder toten Spermien abzutrennen.

Zuerst wurde das verflüssigte Ejakulat dazu gewaschen, indem es mit dem Sperm Preparation Medium (SPM) (Origio, Måløv, Dänemark) im Verhältnis 1:1 verdünnt wurde, wobei das SPM bei 37°C und 5% CO₂ in der Luft vorequiliibriert war. Anschließend wurde die Probe für 10 Minuten bei 200 g zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland), der Überstand verworfen und das Pellet mit 0,5 ml des ebenfalls vorequiliibrierten In-Vitro-Fertilisationsmedium (IVFM) (Origio, Måløv, Dänemark) überschichtet. Während der folgenden 60-minütigen Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ konnte der Selektionsprozess stattfinden, indem die beweglichen Spermien aus dem Pellet in das Medium schwammen. Der Probenbehälter wurde dabei in einem Winkel von 45° positioniert, damit die Kontaktfläche zwischen Medium und Pellet vergrößert wurde. Außerdem können sich die Zellen während des Swim-ups im IVFM der Kapazitation unterziehen.

Tamburrino et al. zeigten, dass nach Swim-up-Selektion der Anteil der Catsper-1-exprimierenden Zellen deutlich höher war und die Zellen höhere basale und Progesteron-stimulierte Kalziumlevel zeigten (Tamburrino et al. 2014). Da in dieser Arbeit Progesteron-induzierte Kalziumsignale untersucht werden sollen, ist dieser Aufbereitungsschritt wichtig und erhöht den Anteil der reagierenden Zellen.

Das IVFM ist ein Bikarbonat-gepuffertes Zellkulturmedium, dem humanes Serumalbumin (HSA) als Proteinquelle und Glucose als Energielieferant beigefügt sind. Sowohl das Bikarbonat als auch das HSA unterstützten die Kapazitation der Spermien während der Inkubation.

Nach der Inkubation wurde der die motile Zellen enthaltene Überstand vorsichtig abpipettiert und in ein neues Gefäß überführt. Es erfolgte erneut die Bestimmung der Konzentration und der Motilität der Spermien, abschließend wurden die Proben für die spätere Verwendung bei 37°C und 5% CO₂ aufbewahrt.

3.4 Probenaufbereitung für das Kalzium-Imaging

Die Swim-up-Proben wurden für 5 Minuten bei 200 g zentrifugiert, der entstehende Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl modifiziertem Human-Tubal-Fluid-Medium (HTFM) (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) resuspendiert. Das HTFM ist HEPES-gepuffert, sodass der pH-Wert an der Luft stabil bleibt. Da das zuvor verwen-

dete IVFM Bikarbonat-gepuffert ist, wäre die Pufferkapazität bei dem Transport und den Messungen in einer offenen Perfusionskammer verloren gegangen, sodass der Wechsel des Mediums zu dem luftstabilen HTFM an dieser Stelle nötig war. Des Weiteren ist dem HTFM, im Gegensatz zu dem IVFM, kein humanes Serumalbumin (HSA) beigesetzt. Da das HSA bei den Kalziumionenkonzentrationsmessungen sowohl mit den Kalziumionen als auch mit dem Farbstoff Fura-2 interagieren könnte, ist die Verwendung von HSA-freiem Medium wichtig, um die Stabilität der Messungen zu gewährleisten.

Der Transport der aufbereiteten Proben vom IVF-Labor zum Standort des Mikroskops erfolgte in einem Polystyrencontainer, um ein Auskühlen der Proben zu vermeiden.

3.5 Kalzium-Imaging mit Fura-2-AM

3.5.1 Versuchsaufbau

Für die Messungen wurde ein inverses Epifluoreszenzmikroskop (Axiovert Z1, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) mit einem LD Plan Neofluar 40 x NA 0,6 Objektiv (Carl Zeiss Jena GmbH) benutzt. Zur Fluoreszenzanregung wurde eine Xenonlampe in Verbindung mit einem Monochromator (Polychrome V, TILL Photonics GmbH, Gräfelfing, Deutschland) und einem 395 nm Kurzpass-Filter (AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland) verwendet. Für die Anregung bei 340 nm wurde eine Expositionszeit von 400 ms und bei 380 nm eine Zeit von 80 ms gewählt. Anregungs- und Fluoreszenzlicht wurden durch einen 409 nm Strahlteiler (Semrock, Rochester, New York, USA) getrennt. Das Fluoreszenzlicht wurde mit einem 470-550 nm Bandpassfilter (Semrock) gefiltert und mit einer AxioCam C1 (Carl Zeiss) aufgezeichnet. Die Aufzeichnung und Auswertung der Daten erfolgte mithilfe der Software Axiovision 4.8 (Carl Zeiss Jena GmbH) (Reimann 2013).

Die vorbereiteten Spermien wurden in die Perfusionskammer gegeben. Diese besteht aus einem Metallgehäuse mit mehreren Leitungen (Rotilabo®-PE-Schlauch, transparent, Ø innen 1 mm, Ø außen 1,8 mm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), über die Zu- und Abfluss erfolgen. Den Boden der Kammer bildet ein Deckgläschen mit 25 mm Durchmesser (Nach Verfügbarkeit Menzel Gläser, Braun-

schweig Deutschland oder VWR International, Darmstadt, Deutschland). Die Deckgläschen wurden mit Poly-D-Lysin (Milipore, Darmstadt, Deutschland) beschichtet, um ein besseres Haften der Zellen zu gewährleisten. Dazu wurden kleine Tropfen (ca. 10 µL / Tropfen) einer Lösung aus Reinstwasser und 50 µg / ml Poly-D-Lysin auf die Deckgläschen pipettiert und bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

Die verschiedenen eingesetzten Lösungen wurden in Spritzen gefüllt, die über Schläuche mit der Perfusionskammer verbunden wurden. Da die Spritzen immer in etwa 10 cm über der Kammer befestigt wurden, erfolgte die Perfusion allein durch die Gravitation. Eine Pumpe wurde verwendet, um den schnellen Abfluss der Substanzen sicher zu stellen und den Flüssigkeitsspiegel in der Kammer konstant zu halten (Abbildung 8). Vor jeder Messung wurden die Schläuche luftleer gefüllt, um einen konstanten Fluss ohne störende Luftblasen zu erhalten. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, die bei $18,6 \pm 1,6$ °C lag.

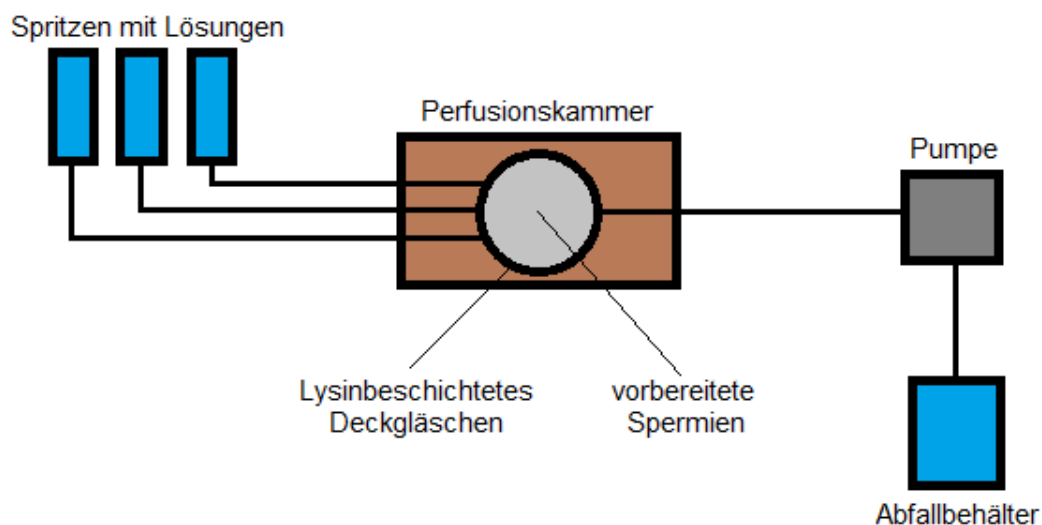


Abbildung 8: Schematischer Versuchsaufbau. Die Lösungen perfundieren die Kammer durch Gravitationskraft. Der Abfluss wird durch eine Pumpe unterstützt.

3.5.2 Anfärben und Messen am Mikroskop

Als Kalziumindikator wurde Fura-2-AM (Molecular Probes, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Zum Beladen der Spermien mit dem Farbstoff wurde eine 1 mM Fura-2-AM-Lösung in DMSO erstellt und diese bei -80°C gelagert. 1 μl dieser Lösung wurde vor Versuchsbeginn zu 500 ml der Spermien-HTF-Suspension gegeben. Daraus resultiert für Fura-2-AM eine Endkonzentration von 2 μM . 300 μl dieses Gemisches wurden in die Kammer gegeben und 30 Minuten inkubiert. Der Raum war dabei abgedunkelt um ein Ausbleichen durch Licht zu verhindern. Nach der 30-minütigen Inkubationszeit wurde die Kammer für ca. 3-5 Minuten mit 10 ml HTFM perfundiert, um den überschüssigen Farbstoff und die ungebundenen Zellen zu entfernen.

Es wurde eine geeignete Region auf dem Deckgläschen mit gebundenen, vital beweglichen Zellen ausgewählt. Anschließend wurde die Messung gestartet. Dabei wurden Bilder in Abständen von 1-5 Sekunden aufgenommen. Sobald sich ein konstantes Fluoreszenzsignal über einige Minuten zeigte, wurde die Kammer erneut mit 2-3 ml HTF gespült, um die letzten Farbstoffrückstände zu entfernen und den Einfluss der Perfusion auf die Zellen beurteilen zu können. Unmittelbar danach erfolgte die Substanzzugabe. Die Effekte wurden jeweils für 10 Minuten weiter beobachtet, um die relevanten Veränderungen der Kalziumionenkonzentration aufzuzeichnen.

3.6 Durchgeführte Versuche

Progesteron wurde in einer Konzentration von 3 μM verwendet, da für diese Konzentration gezeigt wurde, dass sie im weiblichen Genitaltrakt vorkommt und somit physiologisch relevant ist (Osman et al. 1989). Das Progesteron (Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland) wurde in Ethanol gelöst und eine Stammlösung mit 3 mM Progesteron im Kühlschrank aufbewahrt. Für die Versuche wurde diese Stammlösung 1:1000 mit dem HTFM verdünnt, damit eine Endkonzentration von 3 μM erhalten wurde. In zehn Messungen wurde die Progesteronkontrolle ermittelt, mit der die folgenden Untersuchungen verglichen werden können. Neun dieser zehn Messungen eigneten sich auch für den ersten Teil der Arbeit, der sich mit Untersuchungen zu Kalziumsignalen und Morphologie befasst. Hier wurden die Zellen entsprechend ihrer Morphologie als normal oder abnormal eingeteilt und die beiden Gruppen anschlie-

ßend getrennt ausgewertet und miteinander verglichen. Bei fünf der zehn Versuche wurde 10 Minuten nach der ersten Progesteronzugabe ein weiteres Mal Progesteron zugegeben und die Effekte der zweiten Wirkstoffzugabe wiederum für 10 Minuten verfolgt. Diese Untersuchung sollte prüfen, ob wiederholte Progesteronstimulation zu einer Toleranzentwicklung mit abnehmender Stimulierbarkeit von Kalziumsignalen führt.

Für die Untersuchungen mit dem Progesteronrezeptormodulator wurde aus Ulipristal (Toronto Research Chemicals, Toronto, Kanada) und Ethanol eine 5 mM-Stammlösung hergestellt und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Diese wurde für die Ulipristalversuche entsprechend mit HTFM verdünnt. Acht Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationen dienten als Dosisfindung. Hier zeigte sich bei einer Konzentration von 20 µM Ulipristal ein reproduzierbarer Effekt auf den Kalziumeinstrom, sodass in den Hauptversuchen Ulipristal in dieser Konzentration eingesetzt wurde. Um die Interaktion von Ulipristal und Progesteron zu untersuchen, wurde in drei weiteren Versuchen erst Ulipristal und nach weiteren 10 Minuten Progesteron zu den Zellen gegeben. Die Ulipristalkontrolle wurde dann zum einen aus vier Versuchen mit 20 µM Ulipristal aus der Dosisfindung zum anderen aus den ersten Teilen der drei Messungen ermittelt, so dass insgesamt sieben Versuche für die Bestimmung der Ulipristalkontrolle verwendet wurden. Um mögliche kompetitive Effekte der Substanzen zu erkennen, erfolgte bei drei Messungen die Zugabe von Progesteron und Ulipristal gleichzeitig (Abbildung 9).

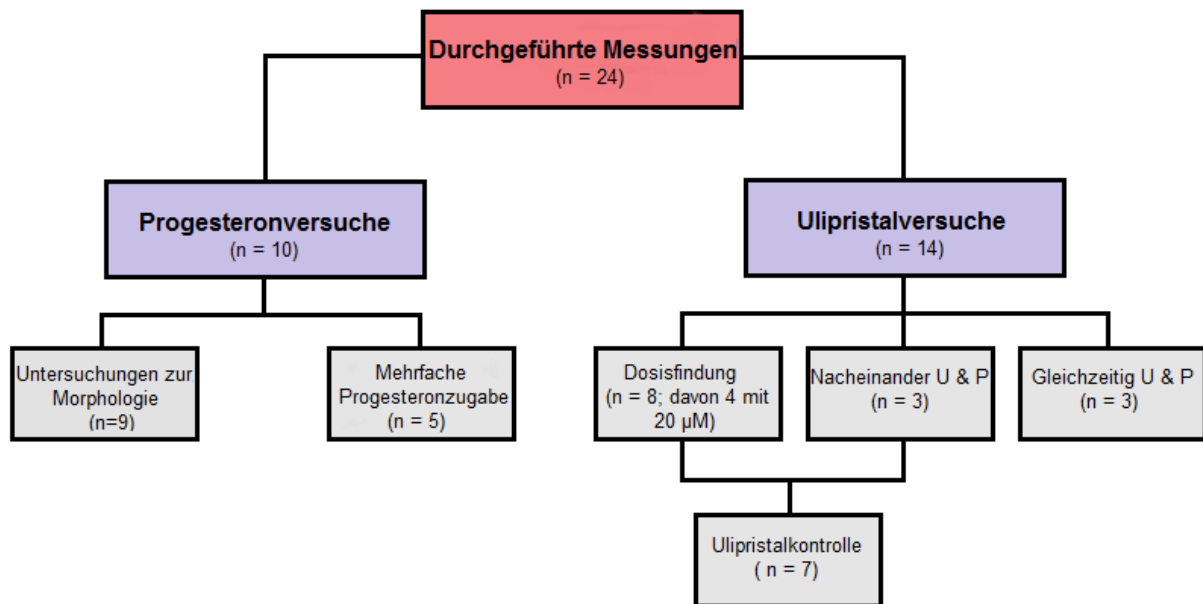


Abbildung 9: Übersicht der durchgeführten Versuche. Insgesamt waren 24 Messungen auswertbar. U: Ulipristal. P: Progesteron.

3.7 Datenanalyse

Die Daten wurden nach Abschluss der Kalziummessungen mit der Software Axio Vision (Version 4.8, Carl Zeiss) analysiert. Dabei wurden bei jeder Aufnahme bis zu 25 Spermienzellen ausgewertet, indem um jede Zelle eine Ellipse gezeichnet wurde, die den auszuwertenden Bereich definiert. Innerhalb dieser Regions of interest (ROIs) wurde von der Software die mittlere Fluoreszenzintensität bestimmt. Zusätzlich zu den die Zellen markierenden ROIs wurde in jeder Messung die Hintergrundfluoreszenz durch ein 100x100 Pixel Quadrat bestimmt (Abbildung 10).

Die Auswahl der Zellen im Gesichtsfeld erfolgte zufällig unter der Voraussetzung, dass die analysierte Zelle nicht von anderen fluoreszierenden Zellen überlagert wurde. Auch Zellen, die sich zu stark bewegten und während der Messung die ROI verließen, wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

Zur Bearbeitung der Daten wurden die ermittelten Fluoreszenzintensitäten in Microsoft Excel 2007 importiert und um die bei den jeweiligen Wellenlängen bestimmte Hintergrundfluoreszenz korrigiert. Da in dieser Arbeit nur der zeitliche Verlauf des Kalziumsignals betrachtet wurde und sich eine Kalibrierung der Messung als nicht praktikabel herausstellte, wurde davon abgesehen, die absolute Kalziumkonzentration zu berechnen. Zur Analyse der Kalziumsignale wurden die Verhältnisse der bei 340 nm und 380 nm bestimmten Signale ermittelt und graphisch gegen die Zeit aufgetragen. Anhand des zeitlichen Verlaufs der Werte wurden die Zellen in verschiedene Kategorien von Reaktionsmustern eingeteilt (Kapitel 4.1).

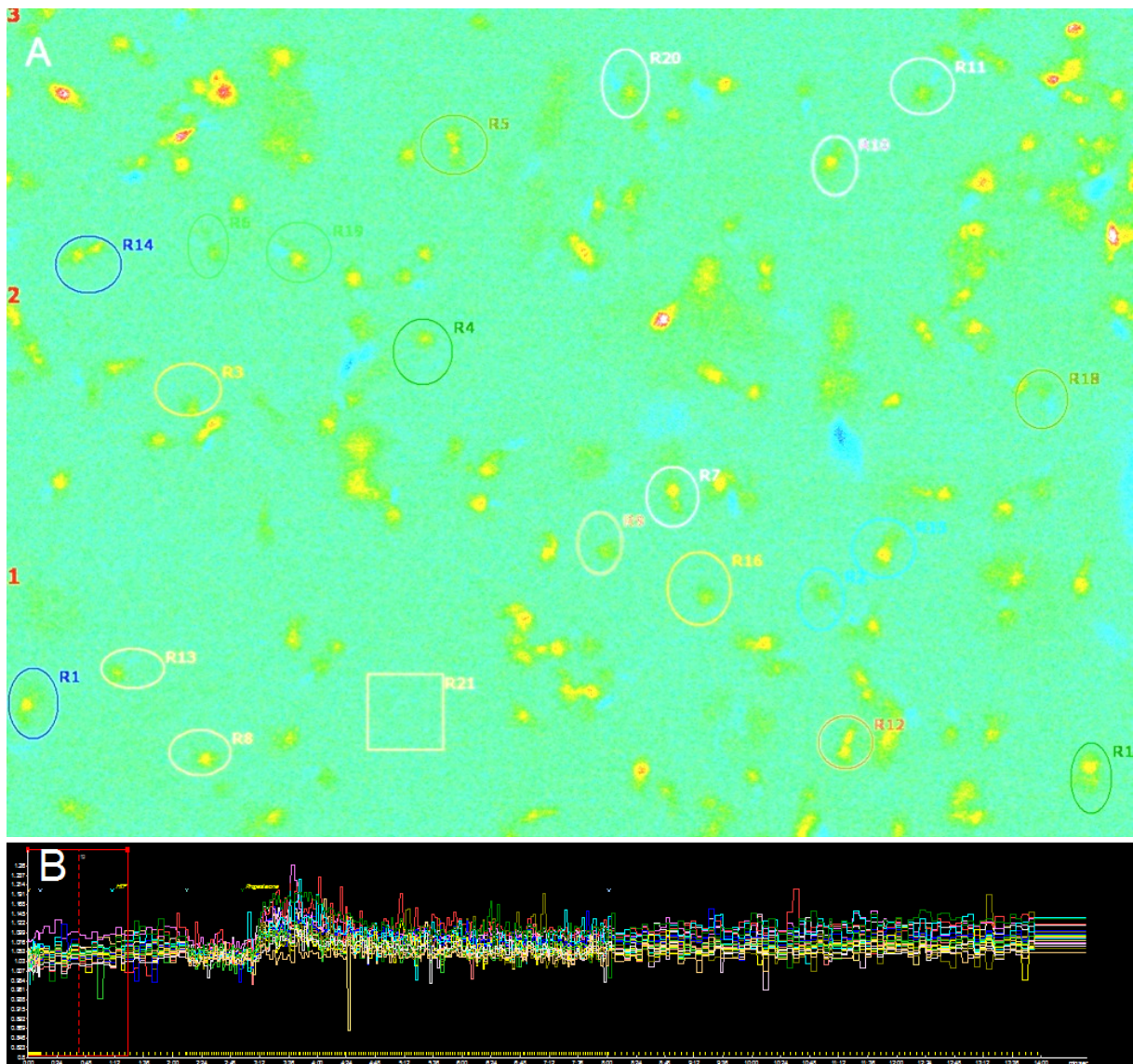


Abbildung 10: Beispiel einer Fluoreszenzmessung. A: Falschfarbenbild des Quotienten der bei Anregung um 340 nm und 380 nm ermittelten Fluoreszenzintensitäten. Grün entspricht einer niedrigen Kalziumionenkonzentration, mit steigender Kalziumionenkonzentration ändert sich die Färbung über gelb zu rot. Die Ellipsen markieren die zur weiteren Auswertung definierten ROIs. Das Quadrat umrandet den Bereich, der für die Hintergrundkorrektur herangezogen wurde. B: Graphische Darstellung der Intensitätsquotienten für jedes einzelne ROI.

3.8 Statistische Analyse

Statistische Unterschiede zwischen den Proben wurden mit dem zweiseitigen t-Test analysiert. Die Werte sind als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Das Signifikanzniveau wurde bei $p \leq 0,05$ festgelegt.

3.9 Morphologiebeurteilung

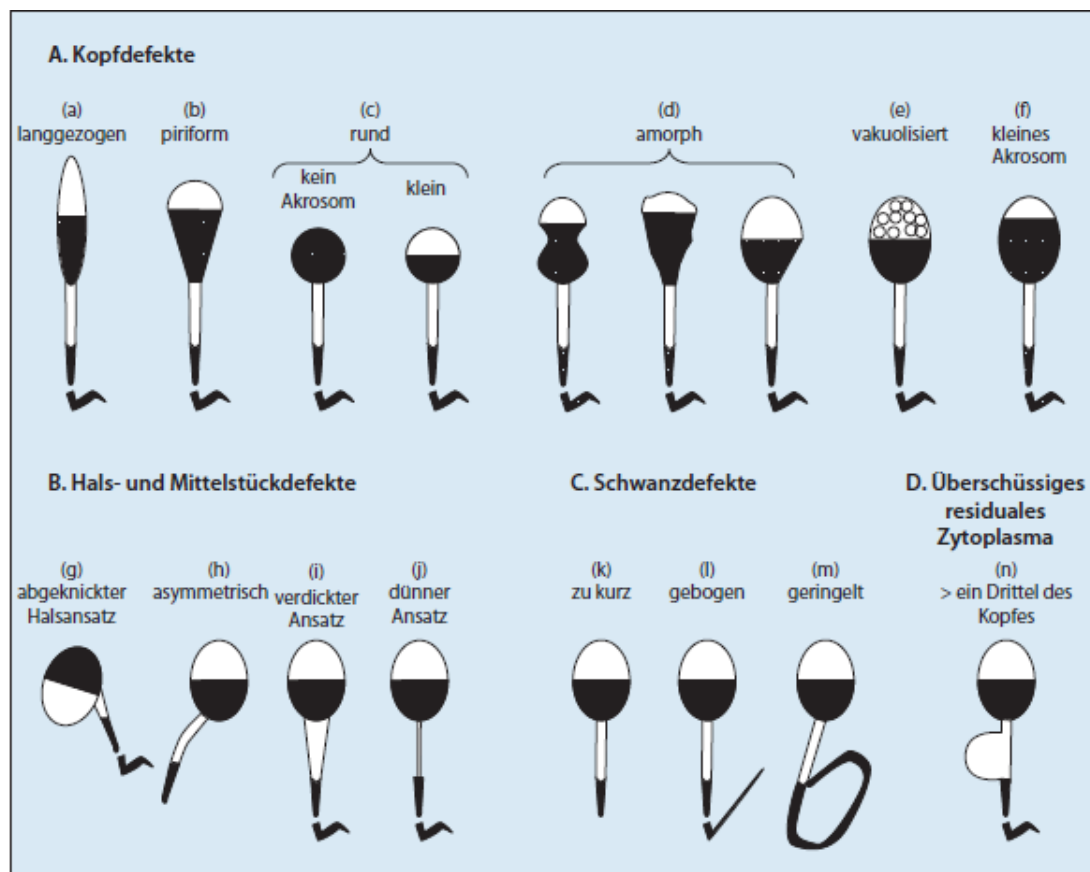
Es erfolgte die Unterscheidung der Spermien in abnormal und normal gemäß der Empfehlungen der 5. Auflage des WHO Laborhandbuches (Nieschlag und Bongers 2012). Ein Spermium wird als normal klassifiziert, wenn es einen normal geformten Kopf, Hals, Mittelstück und Schwanz besitzt (Tabelle 2). Ein abnormales Spermium dagegen weist in mindestens in einem dieser Teile eine Auffälligkeit auf (Tabelle 3, Abbildung 11). Dabei wurden vor allem Kopf- und Mittelstückdefekte beurteilt, da das Endstück in vielen Fällen nicht sichtbar war. Pathologien der Endstücke gingen nur dann in die Bewertung ein, wenn sie erfasst waren. Vakuolen und Akrosomregion waren im Durchlichtbild oft nicht sicher beurteilbar. Sie wurden nur bei eindeutig pathologischen Befunden bewertet.

Tabelle 2: Kriterien eines normal geformten Spermiums (Nieschlag und Bongers 2012)

Kopf	Glatt, regelmäßige Konturen, oval, Akrosomreaktion 40-70% des Kopfes, ≤ 2 Vakuolen $\leq 20\%$ des Kopfes in Akrosomregion, keine Vakuolen postakrosomal
Hals/Mittelstück	Schlank, regelmäßig, etwa Kopflänge, in Hauptachse mit Kopf, residuales Zytoplasma $\leq 1/3$ der Spermienkopflänge
Schwanz	Einheitliches Kaliber, dünner als Mittelstück, etwa 10 fache Kopflänge

Tabelle 3: Kriterien eines abnormalen Spermiums (Nieschlag und Bongers 2012)

Kopf	Groß oder klein, kegelförmig, birnenförmig, rund, amorph, vakuoliert (>2 Vakuolen >20% in der Akrosomregion), Vakuolen postakrosomal, zu kleine/große Akrosomregion, doppelte Köpfe
Hals/Mittelstück	Asymmetrischer Ansatz am Kopf, dick oder unregelmäßig, scharf gebogen, abnormal dünn, residuales Zytoplasma >1/3 der Spermienkopfgroße
Schwanz	Kurz, mehrfach vorhanden, gebrochen, glatte Haarnadelkurven, scharf abgewinkelte Kurven, unregelmäßige Breite, aufgerollt

**Abbildung 11:** Schematische Zeichnungen einiger abnormaler Spermien (Nieschlag und Bongers 2012)

4 Ergebnisse

4.1 Patientendaten

Das durchschnittliche Alter der Männer betrug $35,6 \pm 6,7$ Jahre, im Median waren die Männer 36 Jahre alt. Die Proben wurden zu Zwecken der Diagnostik gewonnen. Die durchschnittlichen SpermioGrammparameter sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: MW und SD von Konzentration und Motilität der Proben

		MW	SD
Konzentration (vor Swim-up)		$53,8 \cdot 10^6$	$26,1 \cdot 10^6$
Konzentration (nach Swim-up)		$41,4 \cdot 10^6$	$29,2 \cdot 10^6$
Motilität (vor Swim-up)	<i>progressiv</i>	48,2%	9,1%
	<i>gesamt</i>	74,5%	7,5%
Motilität (nach Swim-up)	<i>progressiv</i>	68,0%	6,4%
	<i>gesamt</i>	92,7%	2,4%

4.2 Einteilung in Reaktionsmuster

Zur Auswertung der Daten wurden die errechneten Intensitätsquotienten über die Zeit aufgetragen und gemäß ihres Verlaufes in eine der fünf folgenden Kategorien eingeteilt (Abbildung 12).

Kategorie A entspricht dabei dem in der Literatur als typisch beschriebenen raschen Anstieg der intrazellulären Kalziumionenkonzentration nach Progesteronstimulation (Harper et al. 2003, Strünker et al. 2011). Der Quotient zeigt dabei einen deutlichen Anstieg nach Substanzzugabe auf mindestens das 1,5-fache des Ausgangswertes.

Nach 100 s muss die Intensität wieder unter das Niveau der halbmaximalen Amplitude gesunken sein.

Ist der Peak länger als 100 s wird die Reaktion der Kategorie B zugeordnet, dass heißt nach dieser Zeit ist der Wert noch nicht unter die halbmaximale Amplitude gefallen, unterschreitet diese allerdings vor Ende der Messung.

In Kategorie C zeigt der Graph eine Oszillation. Eine Oszillation besteht zumindest aus drei aufeinander folgenden Peaks oder raschen Oszillationen ohne erkennbare Peaks um die Grundlinie mit einer großen Variabilität der Intensitätsquotienten.

In Gruppe D stellt sich nach Stimulation ein Plateau dar. Das Kalzium fällt bis zum Ende der Messung nicht unterhalb der halbmaximalen Amplitude.

Weist ein Spermium keinen Kalziumanstieg auf mindestens den anderthalbfachen Wert des Intensitätsquotienten nach Hormonzugabe auf, wird es in Kategorie E eingeteilt.

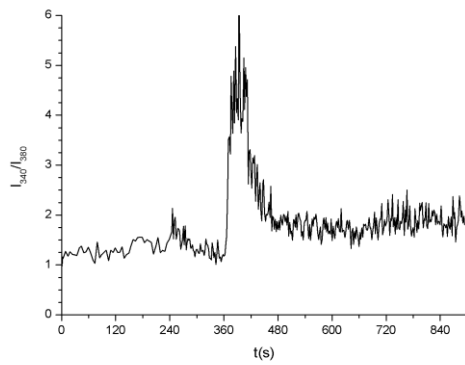
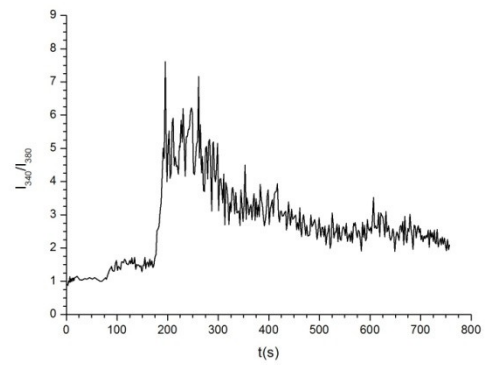
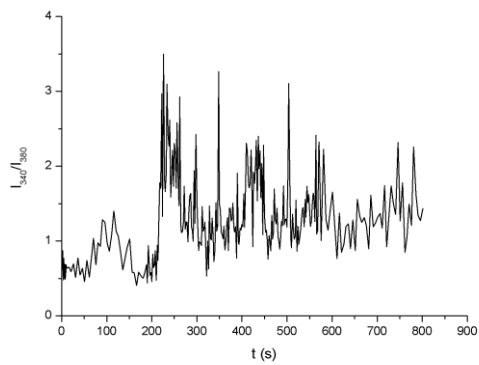
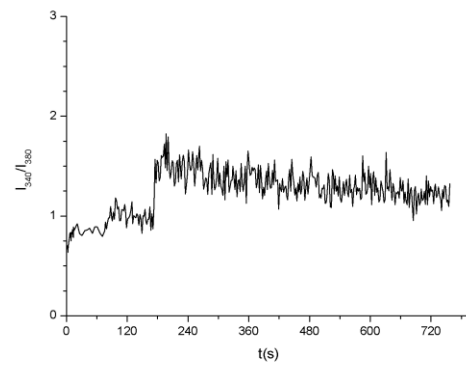
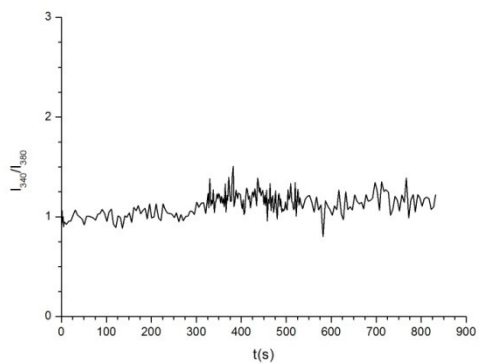
A**B****C****D****E**

Abbildung 12: Kategorien der Reaktionsmuster. A: Normaler Peak ≤ 100 s. B: verlängerter Peak > 100 s. C: Oszillation. D: Plateau. E: keine Reaktion.

4.3 Progesteronstimulation

In den nachfolgenden Versuchen werden die Ergebnisse oft mit der alleinigen Progesteronstimulation durch eine 3 μM Lösung verglichen. Um diese Kontrollwerte zu erhalten, wurde bei zehn Proben Progesteron zu den Zellen gegeben und die Fluoreszenzintensität aufgezeichnet. Der aus der Literatur bekannte rasche Kalziumanstieg (Kirkman-Brown et al. 2000) trat auch beim Life-Cell-Imaging bei mehr als 70 % der untersuchten Zellen auf (Abbildung 13).

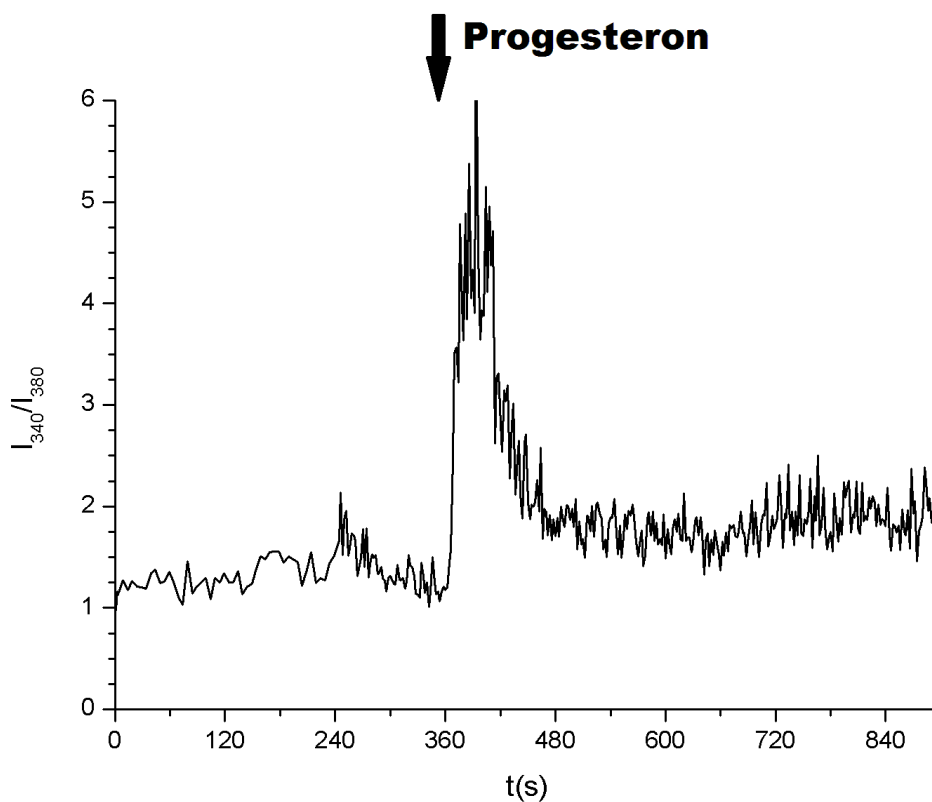


Abbildung 13: Rascher Kalziumanstieg nach Progesteronstimulation.

Tabelle 5: Progesteronkontrolle. Mittlere prozentuale Verteilung der Reaktionsmuster (n=10)

Kategorie	MW (%)
A (normal)	72,4
B (verlängert)	4,9
C (oszillierend)	15,3
D (Plateau)	4,8
E (negativ)	2,7

Da allerdings zu knapp 30 % auch andere Reaktionsmuster beobachtet wurden, erfolgte für die weitere Auswertung die Kategorisierung der zellulären Antworten entsprechend der oben beschriebenen Reaktionsmuster (Abbildung 12). MW \pm SEM ergaben sich aus der Auswertung der Verteilung der Reaktionsmuster der zehn Ejakulate. Dabei trat die normal geformte Kurve mit 72,4 % \pm 6,9 % am häufigsten auf (Tabelle 5).

4.4 Morphologie und Kalziumsignal

Jeder Zelle wurde wie bereits beschrieben anhand der Form ihres Graphen eine Kategorie zugeordnet. Unabhängig von dieser Einteilung wurden die Spermien lichtmikroskopisch in 400-facher Vergrößerung entsprechend ihrer Morphologie als normal oder pathologisch klassifiziert (Abbildung 14). Zellen, die sich im Durchlichtbild nicht eindeutig zuordnen ließen, zum Beispiel durch Überlagerung, wurden bei der weiteren Betrachtung nicht berücksichtigt. Insgesamt wurden 159 Spermien aus neun Ejakulaten analysiert, wobei 72 Spermien als morphologisch normal und 87 Spermien als morphologisch auffällig bewertet wurden.

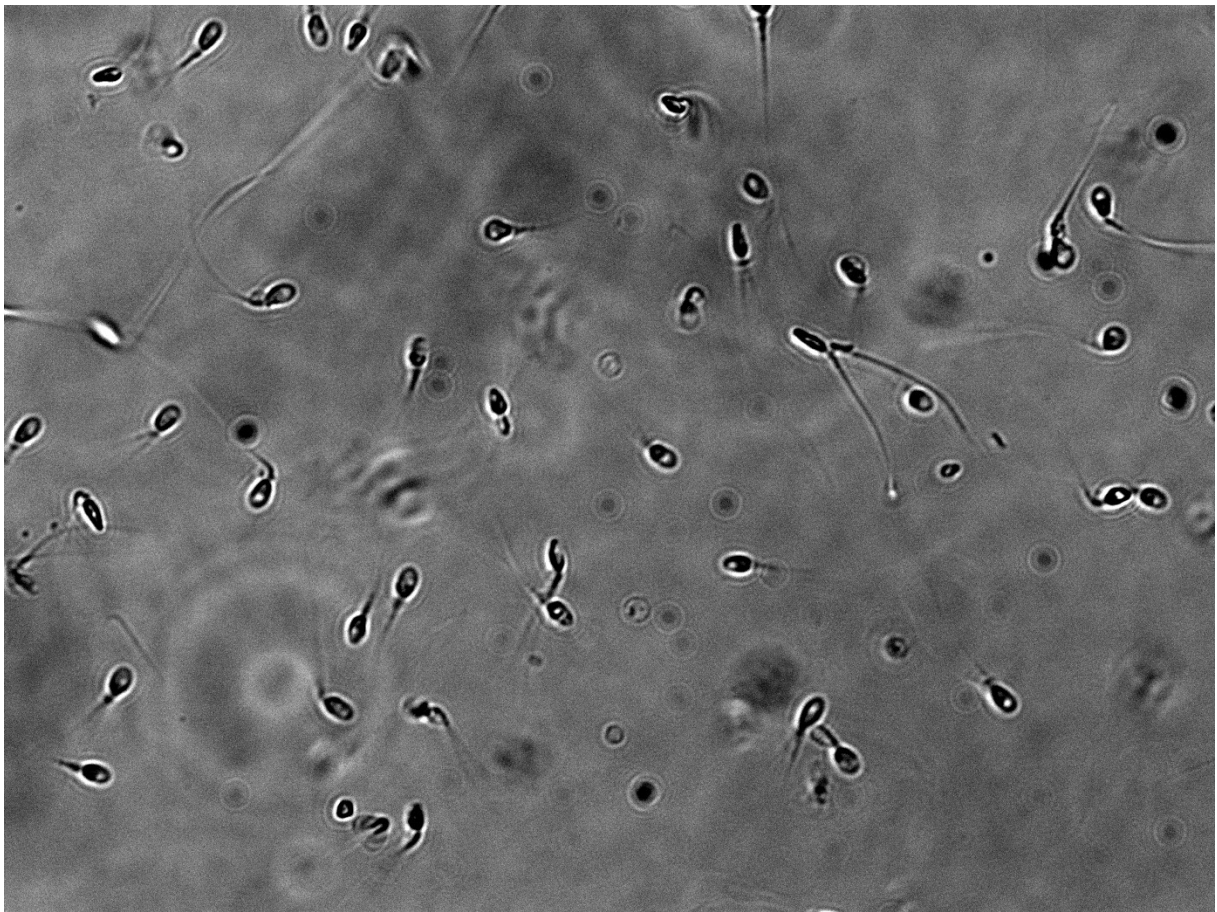


Abbildung 14: Lichtmikroskopie der Spermien (400-fache Vergrößerung). Grundlage für die Bestimmung der Zellmorphologie.

Es wurden die Progesteron-induzierten Kalziumeinströme bei Spermien mit normaler und abnormaler Morphologie verglichen, um zu überprüfen, ob das Aussehen der Zelle eine Rolle für die Kalzium-vermittelten Spermienfunktionen spielt. Sowohl bei den Spermien mit auffälliger als auch bei denen mit normaler Morphologie war die normal konfigurierte Kurve am häufigsten zu beobachten. Dabei gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. In der Gruppe mit normaler Morphologie trat bei $74,9 \pm 6,0$ % der Zellen ein normaler Kalziumanstieg auf, während sich dieser in der Gruppe mit pathologischer Morphologie bei $71,9 \pm 7,7$ % der Zellen zeigte.

Auch in den anderen Kategorien konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen gefunden werden (Abbildung 15). Reaktionsmuster der Kategorie B mit einem verlängerten Peak traten zwar häufiger bei den morphologisch auffälligen Spermien auf, während die normal konfigurierten Spermien häufiger eine oszillierende Kurve aufwiesen, dieser Unterschied war jedoch ohne statistische Signifikanz (Tabelle 6).

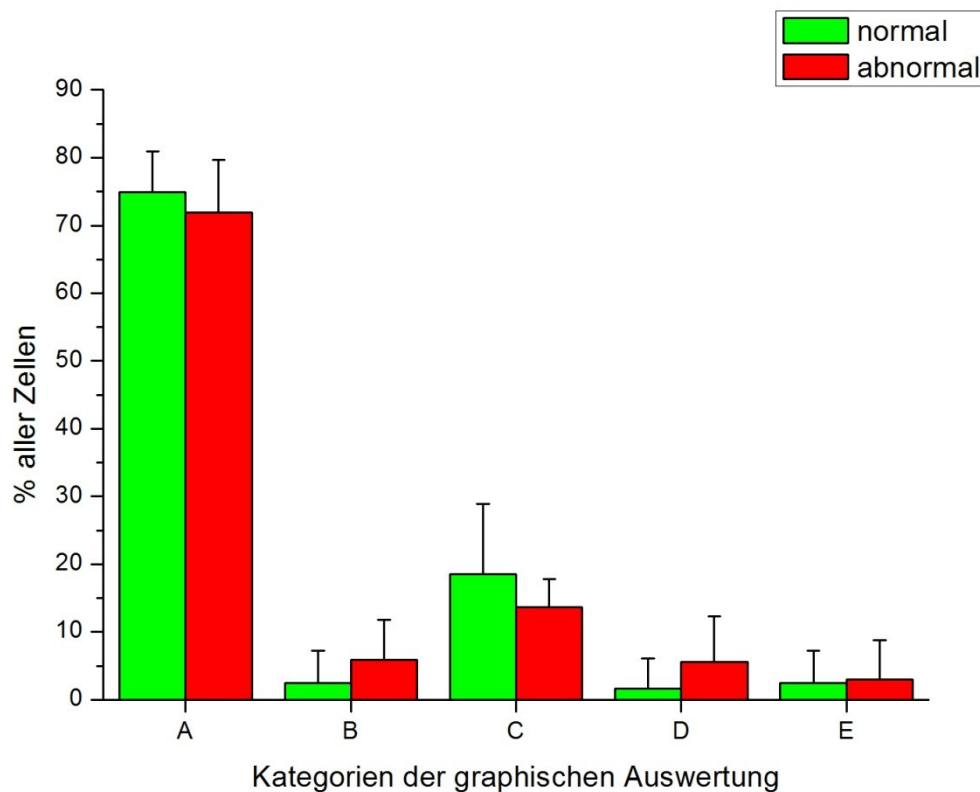


Abbildung 15: Zellmorphologie und Progesteronsignal. MW und SEM der Kategorien A-E. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen konnten nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 6: MW und SEM der morphologisch zugeteilten Gruppen (n=9)

<i>Kategorie</i>	Normale Morphologie		Abnormale Morphologie		P-Wert
	<i>MW (%)</i>	<i>SEM (%)</i>	<i>MW (%)</i>	<i>SEM (%)</i>	$\alpha = 0,05$
A (normal)	74,9	6,0	71,9	7,7	0,41
B (verlängert)	2,5	4,7	5,9	5,8	0,22
C (oszillierend)	18,5	10,4	13,7	4,0	0,23
D (Plateau)	1,6	4,5	5,5	6,7	0,18
E (negativ)	2,5	4,7	3,0	5,8	0,86

4.5 Wiederholte Progesteronstimulation

In der Literatur wird ein Gewöhnungseffekt der Spermien auf eine wiederholte Progesteronstimulation beschrieben (Harper et al. 2003). Da diese Toleranzentwicklung bei der Auswertung und Beurteilung der folgenden Versuche relevant ist, wurde an fünf Proben überprüft, wie die Zellen auf mehrmalige Progesteronzugabe reagieren. Dabei bestätigte sich, dass die zweite Progesteronstimulation nicht den gleichen Effekt wie die erste Hormongabe erzielen konnte. Ein normaler geformter schneller Kalziumanstieg zeigte sich nach der zweiten Progesteronzugabe nur bei $35,0 \% \pm 9,4 \%$ der Zellen (Abbildung 16), wohingegen bei der ersten Progesteronstimulation mit $70,0 \% \pm 3,8 \%$ etwa doppelt so viele Zellen dieses Reaktionsmuster zeigten. Dafür zeigten die Zellen während der zweiten Progesteronzugabe signifikant häufiger Oszillationsmuster oder überhaupt keine Reaktion (Abbildung 16, Tabelle 7). Daraus lässt sich schließen, dass durch mehrfache Hormonzugabe der Progesteroneffekt auf die Kalziumsignale sinkt. Dies bestätigt die bereits von Harper et al. beschriebene Empfindlichkeitsabnahme des Rezeptors bei wiederholter Stimulation.

Tabelle 7: Wiederholte Progesteronzugabe (n=5)

	1. Zugabe		2. Zugabe		P-Wert
Kategorie	MW (%)	SEM (%)	MW (%)	SEM (%)	$\alpha = 0,05$
A (normal)	70,0	3,8	35,0	9,4	0,0001
B (verlängert)	5,0	4,9	0,0	0	0,0735
C (oszillierend)	17,3	5,3	36,3	4,4	0,0006
D (Plateau)	3,3	2,8	6,7	13,3	0,6483
E (negativ)	4,3	3,9	22,0	13,3	0,0345

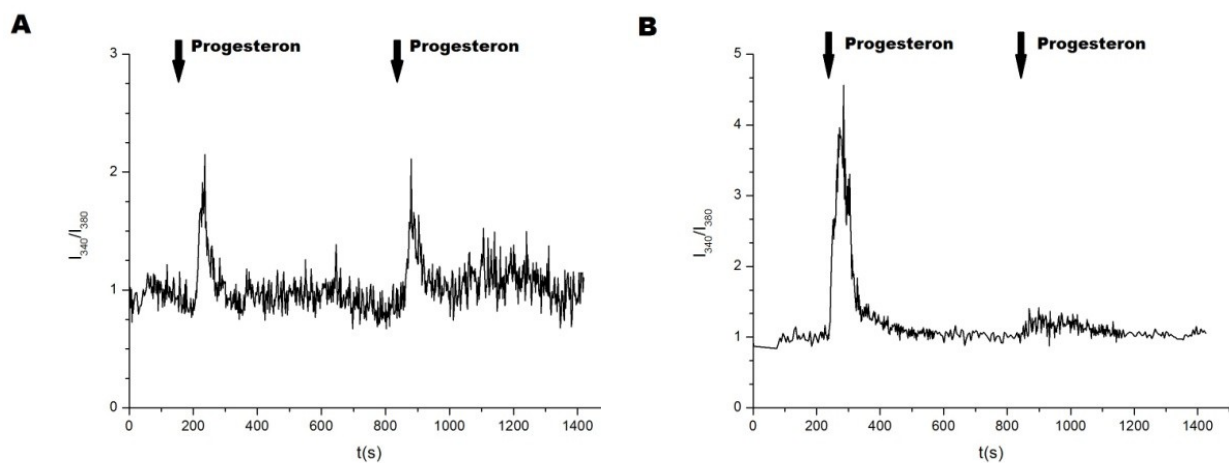


Abbildung 16: Verschiedene Reaktionen bei wiederholter Progesteronstimulation. A: Beide Zugaben bewirken einen normalen biphasischen Kalziumanstieg. B: Die zweite Progesteronzugabe hat keinen Effekt auf den Kalziumspiegel.

4.6 Untersuchungen zur Wirkung von Ulipristal

4.6.1 Dosisfindung

Um einzuordnen, ob und in welcher Konzentration Ulipristal auf den Kalziumeinstrom von Spermien wirkt, wurde die Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen der Substanz getestet. Dabei fiel auf, dass erst eine 20 μM Ulipristal-Lösung bei mehr als zwei Dritteln der Zellen den typischen, in Kapitel 4.2 als Typ A beschriebenen Verlauf des Kalziumsignals hervorruft. Eine solch hohe Konzentration tritt bei therapeutischer Anwendung der Substanz vermutlich nicht auf, es gibt allerdings keine Untersuchung zu den im Genitaltrakt vorherrschenden Konzentrationen. In niedrigeren Konzentrationen (5, 10, 15 μM) reagierten viele Zellen gar nicht oder in auffälliger Weise entsprechend der Reaktionsmuster B bis E. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde bei weiteren Versuchen Ulipristal in einer Konzentration von 20 μM eingesetzt.

4.6.2 Ulipristalstimulation und Kalziumsignale

Um den Effekt von Ulipristal auf die intrazelluläre Kalziumionenkonzentration der Spermien zu beurteilen, wurde in sieben Messungen die Wirkung des Progesteronrezeptormodulators untersucht. Am häufigsten mit $67,4 \% \pm 5,8 \%$ zeigten die Zellen einen normal geformten Graphen der Kategorie A. Die Verteilung der Kategorien A - D bei der Stimulation mit 20 μM Ulipristal-Lösung unterschied sich dabei nicht signifikant von der nach Stimulation mit 3 μM Progesteron-Lösung. Die Kategorie E trat zwar signifikant häufiger nach Ulipristalstimulation auf, wird aber nur bei wenigen Zellen beobachtet. (Abbildung 17, Tabelle 8). Insgesamt scheinen die beiden Hormone einen ähnlich Effekt auf den Kalziumhaushalt des Spermiums zu haben, auch wenn Ulipristal in einer wesentlich höheren Konzentration als Progesteron eingesetzt werden musste, um diesen zu erzielen.

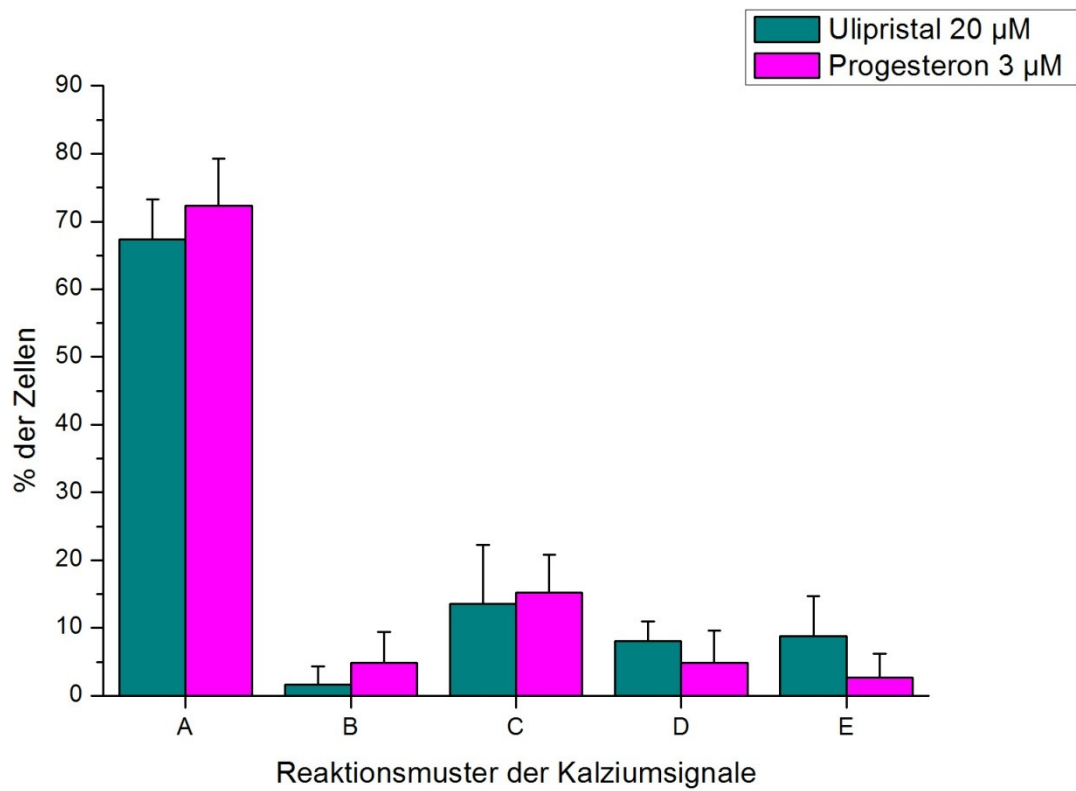


Abbildung 17: Vergleich von Ulipristal- und Progesteronstimulation. Beide Substanzen zeigten eine ähnliche Verteilung der Reaktionsmuster.

Tabelle 8: MW und SEM von Ulipristal- und Progesteronstimulation

Kategorie	Ulipristal 20µM (n=7)		Progesteron 3µM (n=10)		P-Wert
	MW (%)	SEM (%)	MW (%)	SEM (%)	$\alpha = 0,05$
A (normal)	67,4	5,8	72,4	6,9	0,16
B (verlängert)	1,7	2,7	4,9	4,5	0,14
C (oszillierend)	13,6	8,7	15,3	5,5	0,64
D (Plateau)	8,1	2,9	4,8	4,9	0,15
E (negativ)	8,8	5,8	2,7	3,5	0,02

4.6.3 Progesteronsignal nach vorangehender Ulipristalstimulation

Da Ulipristal und Progesteron über denselben Rezeptor auf die intrazelluläre Kalziumionenkonzentration wirken könnten, sind Messungen zur Interaktion beider Substanzen von großer Bedeutung. Um eine potentiell hemmende Wirkung des Ulipristals auf den Progesteron-induzierten Kalziumeinstrom zu ermitteln, erfolgten drei Untersuchungen, die das Progesteronsignal nach einer vorangehenden Ulipristalstimulation aufzeichneten. Dazu wurde zuerst Ulipristal zu den Zellen gegeben und nach 10 Minuten Progesteron hinzugefügt. (Abbildung 18).

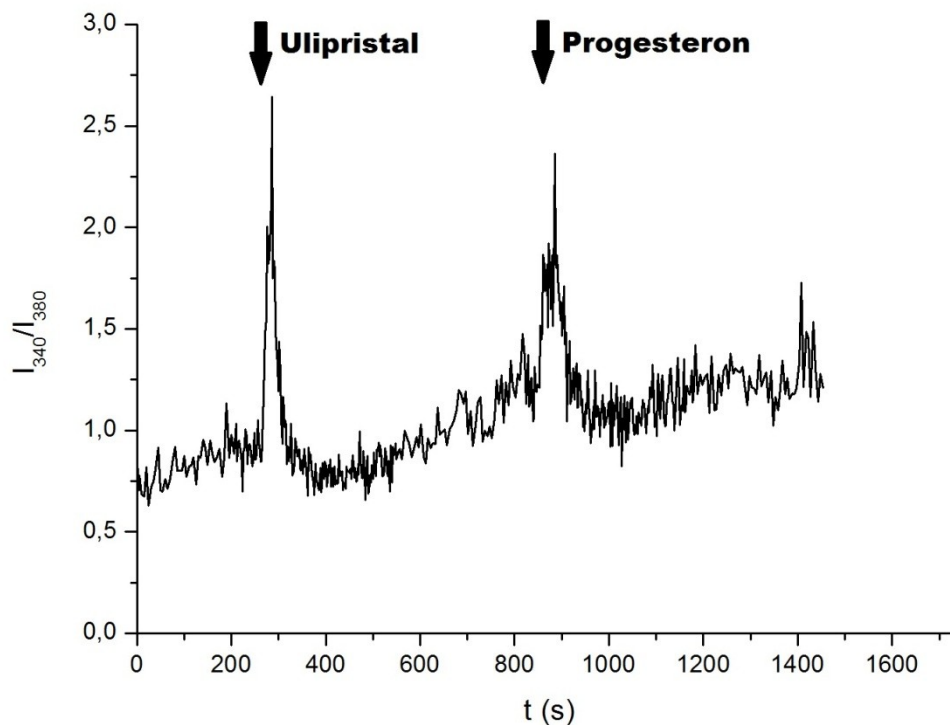


Abbildung 18: Signale nach Ulipristal- und Progesteronzugabe. Zehn Minuten nach Ulipristalzugabe wird Progesteron zu den Zellen gegeben.

Dabei zeigte sich, dass die Spermien bei der Progesteronstimulation nach vorheriger Ulipristalzugabe statistisch signifikant weniger oft die normalgeformte Kurve aufwiesen als bei Progesteronkontrollversuchen (Abbildung 19). Stattdessen reagierten mehr Zellen mit Oszillation oder zeigten gar keinen Kalziumanstieg (Tabelle 9).

Auch im Vergleich zu der vorangehenden Ulipristalstimulation war der Anteil normal reagierender Zellen in dem zweiten Teil der Messungen geringer. Dafür zeigte sich häufiger ein oszillierender Verlauf. Die übrigen Kategorien waren in etwa gleich verteilt.

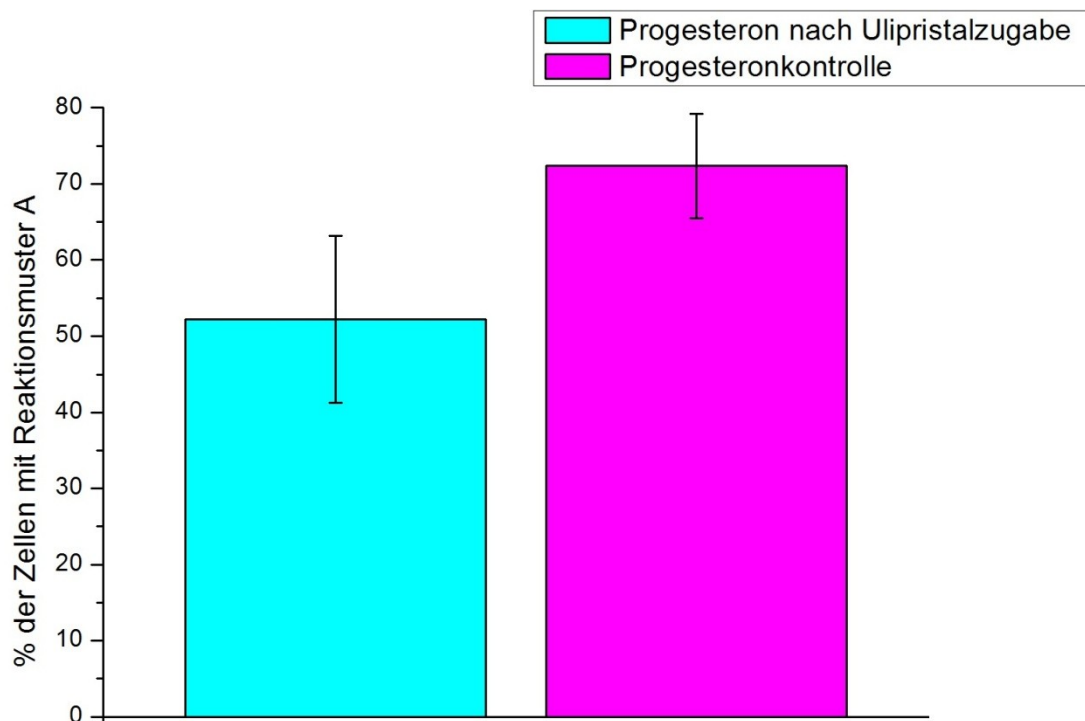


Abbildung 19: Progesteronsignal nach Ulipristalzugabe. Vorangehende Ulipristalzugabe vermindert bei Progesteronstimulation den Anteil der Zellen in Kategorie A im Vergleich zur Progesteronkontrolle.

Tabelle 9: Einfluss der Ulipristalvorbehandlung auf die Progesteronstimulation

	Progesteronsignal nach Ulipristal (n=3)	Progesteronkontrolle (n=10)	P-Wert
	<i>MW(%)</i>	<i>MW(%)</i>	$\alpha = 0,05$
A (normal)	52,2	72,4	0,004
B (verlängert)	3,3	4,9	0,605
C (oszillierend)	28,9	15,3	0,004
D (Plateau)	3,3	4,8	0,705
E (negativ)	12,2	2,7	0,030

Um die Kinetik des Reaktionsmusters genauer zu untersuchen, wurden in der weiteren Analyse nur die Zellen berücksichtigt, die sowohl auf Ulipristal- als auch auf Progesteronstimulation mit einem normalen Peak <100 s der Kategorie A reagierten. Als erstes wurde die Höhe der Amplituden beider Peaks miteinander verglichen. Dabei fiel auf, dass die Peaks in 41 % der Fälle ähnlich hoch mit einer Differenz ihrer Quotienten < 0,5 waren. In ebenfalls 41 % der Fälle war der Progesteronpeak deutlich höher als der des Ulipristals, das heißt, die Quotienten unterscheiden sich um mehr als 0,5. In nur 18 % der Fälle überragte der Ulipristalpeak den des Progesterons (Abbildung 20).

Interessanterweise zeigte sich bei der Auswertung der Fluoreszenzbilder ein Effekt, der in den vorherigen Ergebnissen nicht zur Darstellung kam (Abbildung 21). Der Intensitätsquotient wird in diesen Falschfarbenbildern durch die Farbe korreliert, wobei Rottöne mit einem hohen intrazellulären Kalziumgehalt verknüpft sind. Vergleicht man die Bilder zum Zeitpunkt des Maximalwertes von Ulipristal und Progesteron, so zeigen die Progesteronbilder eine verstärkte Rotfärbung, was auf eine höhere intrazelluläre Kalziumionenkonzentration schließen lässt.

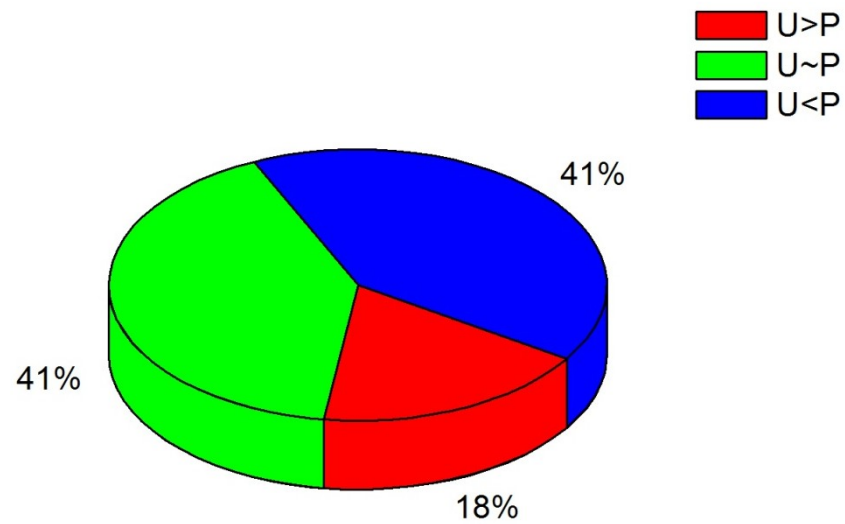


Abbildung 20: Vergleich der Amplitudenhöhe. In nur 18 % der Fälle ist die Amplitude nach Ulipristalstimulation höher.

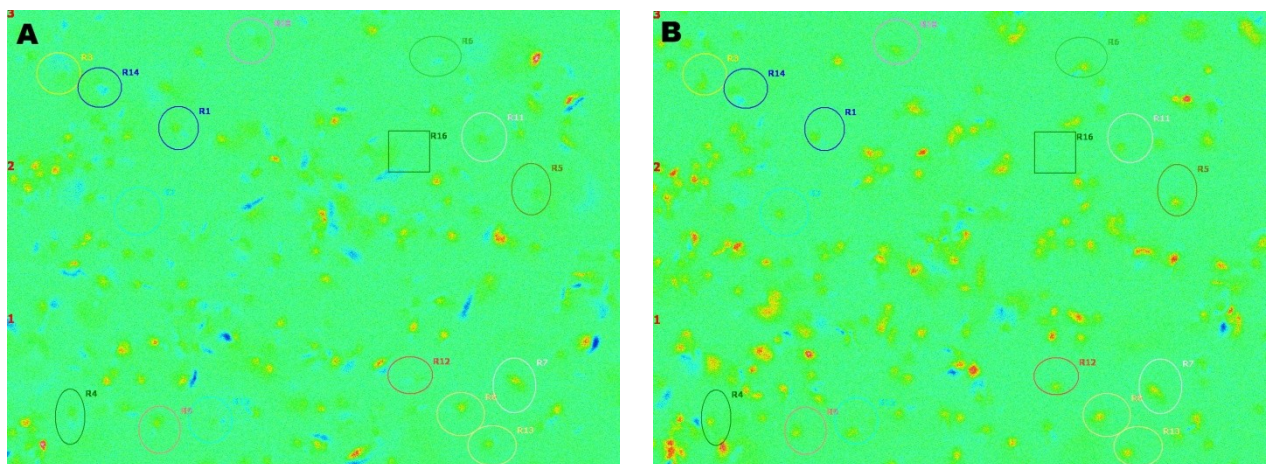


Abbildung 21: Vergleich der Falschfarbenbilder. A: Aufnahme bei maximaler Ulipristalwirkung. B: Aufnahme bei maximaler Progesteronwirkung. Die Rotfärbung ist in Bild B stärker als in Bild A ausgeprägt.

4.6.4 Simultane Stimulation mit Ulipristal und Progesteron

Um die Interaktion von Ulipristal und Progesteron weiter zu untersuchen und potentiell kompetitives Verhalten aufzudecken, wurde in drei Messungen der Effekt bei gleichzeitiger Zugabe der Substanzen über zwei verschiedene Schläuche beobachtet. Dabei wurde eine ähnliche Verteilung der Reaktionsmuster wie bei alleiniger Progesteron- oder Ulipristalstimulation beobachtet (Abbildung 22). Im Vergleich zur Progesteronkontrolle konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede bei der Verteilung der Reaktionsmuster festgestellt werden (Tabelle 10).

Tabelle 10: MW und SEM bei simultaner Zugabe von Ulipristal und Progesteron

	Ulipristal und Progesteron simultan (n=3)		Progesteronkontrolle (n=10)		P-Wert
<i>Kategorie</i>	<i>MW (%)</i>	<i>SEM (%)</i>	<i>MW (%)</i>	<i>SEM (%)</i>	$\alpha = 0,05$
A (normal)	67,9	8,7	72,4	6,9	0,41
B (verlängert)	2,2	3,1	4,9	4,5	0,40
C (oszillierend)	20,2	5,7	15,3	5,5	0,24
D (Plateau)	3,3	4,5	4,8	4,9	0,66
E (negativ)	3,3	4,7	2,7	3,5	0,81

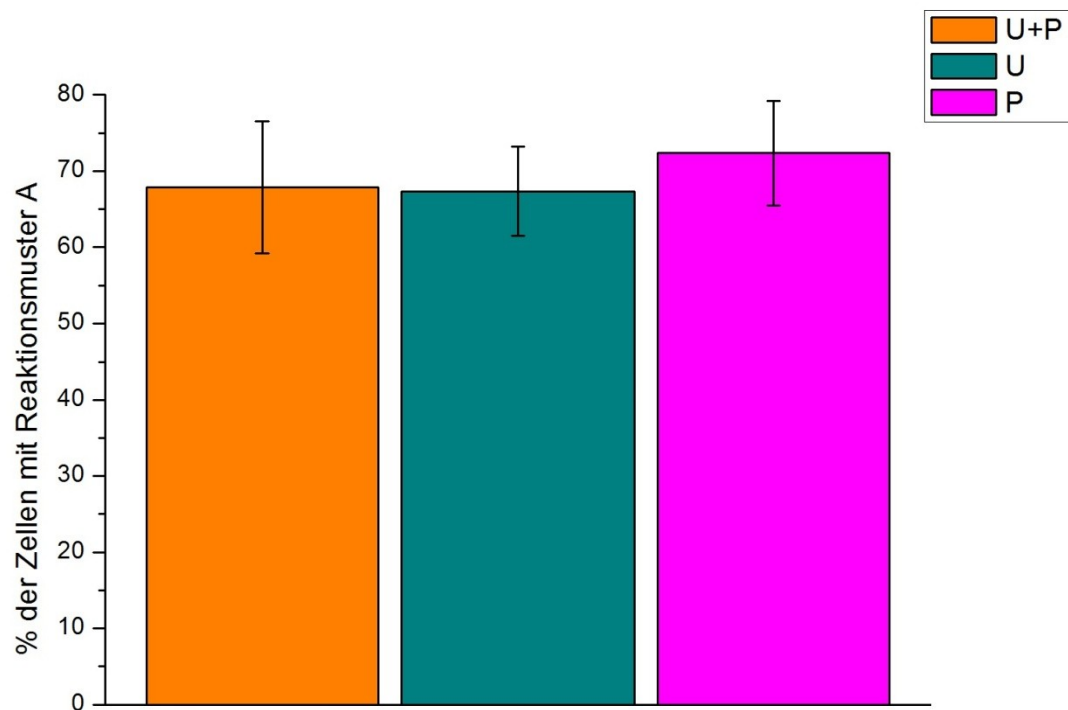


Abbildung 22: Gleichzeitige Stimulation mit Ulipristal und Progesteron. U+P: Häufigkeit der Kategorie A bei gleichzeitiger Zugabe von Ulipristal und Progesteron. U: Kategorie A bei Ulipristalkontrolle. P: Kategorie A bei Progesteronkontrolle. Kategorie A tritt in den drei Gruppen jeweils mit rund 70 % auf.

5 Diskussion

5.1 Kategorien der Reaktionsmuster

In dieser Arbeit erfolgten die Untersuchungen von Kalziumsignalen, da das Kalziumion ein wichtiger intrazellulärer Botenstoff im Spermium ist. Insbesondere der Progesteron-induzierte Kalziumeinstrom spielt bei vielen Prozessen wie der Kapazitation, Akrosomreaktion, Hyperaktivierung und Chemotaxis eine entscheidende Rolle (Baldi et al. 2009). Um die Progesteron-induzierten Kalziumsignale nach physiologischen Gesichtspunkten zu beurteilen, erfolgte eine qualitative Auswertung der Daten mithilfe der graphischen Darstellung des Intensitätsquotienten über die Zeit (Abbildung 12). Der aus der Literatur bekannte schnelle Kalziumanstieg nach Progesteronzugabe (Strünker et al. 2011) wurde hierbei als das physiologische Reaktionsmuster angesehen. Mit 72,4 % aller mit Progesteron-stimulierten Zellen, die dieses Reaktionsmuster A zeigten, sind die Resultate der vorliegenden Studie vergleichbar mit bereits publizierten Daten (Kirkman-Brown et al. 2000).

Dem schnellen Kalziumanstieg folgt ein rascher Abfall der intrazellulären Kalziumionenkonzentration, vermittelt über verschiedene Kalziumeliminationsmechanismen der Zelle. Bleibt dieser Abfall aus oder erfolgt verspätet, entspricht dies dem Reaktionsmuster D beziehungsweise B. In diesen Spermien könnten die Kalziumtransportmechanismen, die zur Wiederherstellung des zytosolischen Kalziumspiegels führen, gestört sein, wobei anzunehmen ist, dass die Abbaumechanismen bei Plateaubildung stärker betroffen sind als bei einer Verlängerung des Peaks. Die Grenze von 100 s zwischen Kategorie A und B mit einem Abfall auf mindestens die Hälfte des Maximalwertes wurde aus zuvor publizierten Quellen abgeleitet (Strünker et al. 2011). Es ist nicht auszuschließen, dass einem verlängerten Kalziumanstieg eine physiologische Bedeutung zukommt, aber da beide Kategorien mit jeweils knapp 5 % nur selten auftraten, ist dies nicht wahrscheinlich.

Bedu-Aldo et al. beschreiben in ihren Ergebnissen einen Anteil von 5-10 % der Zellen, die auf Progesteronstimulation mit Oszillationen reagierten (Bedu-Addo et al. 2007). Dieser Anteil war in dieser Arbeit mit 15,3 % etwas höher, ist aber im Rahmen der Standardabweichung durchaus vergleichbar mit der Angabe der oben genannten Quelle. Kirkman-Brown et al. beschreiben eine große Variabilität des Oszillationsan-

teils zwischen den Proben, die verschiedene Grade der Kapazitation widerspiegeln könnten (Kirkman-Brown et al. 2004). So könnte auch hier die Ursache für den etwas höheren Oszillationsanteil liegen. Die Oszillationen entsprechen vermutlich einer zyklischen Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern (Harper et al. 2004), der extrazelluläre Kalziumeinstrom ist aber mutmaßlich an der Initiation beteiligt (Kirkman-Brown et al. 2004). Einerseits könnten diese zyklischen Schwankungen des intrazellulären Kalziums als eine Dysregulation der Kalziumhomöostase interpretiert werden. Verstärkte Oszillationen wurden aber andererseits auch bei Stimulation mit einem Progesterongradienten gefunden, wie es ihn im weiblichen Genitaltrakt gibt (Harper et al. 2004). Daher könnten die oszillierenden Kalziumsignale für die Ausbildung bestimmter Spermienfunktionen von Bedeutung sein. Möglicherweise entscheidet dabei die Art des Signals über die nachfolgenden Reaktionen.

Spermien, die auf Progesteronstimulation keine Reaktion zeigten, wurden der Kategorie E zugeordnet. Die mangelnde Stimulierbarkeit der Spermien mit Progesteron könnte unter anderem auf eine schwere Störung der Signaltransduktion hindeuten, die das Fehlen vieler wichtiger Spermienfunktionen zur Folge hat. Diese Spermien sind in-vivo vermutlich nicht in der Lage zur Eizelle zu gelangen und diese zu befruchten. Auch nicht-vitale Zellen werden dieser Kategorie zugeordnet. Insgesamt trat die Kategorie E bei 2,7 % der Zellen auf, was die große Bedeutung von Progesteron als Stimulator humaner Spermien unterstreicht.

5.2 Korrelation von Morphologie und Kalziumsignalen

5.2.1 Morphologie und Kalzium

In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der Morphologie eines Spermiums und seinen Kalziumsignalen gibt. Dazu wurden die Spermien hinsichtlich ihrer Morphologie als normal oder abnormal eingeordnet und anschließend die Kalziumsignale der Gruppen miteinander verglichen.

In beiden Gruppen traten die verschiedenen Kategorien der Reaktionsmuster ähnlich oft auf. Die abnormalen Spermien zeigten dabei geringfügig seltener das normale Reaktionsmuster A und dafür etwas häufiger Reaktionen B und D im Sinne einer verzögerten Kalziumelimination. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den

beiden Gruppen, der eine Assoziation zwischen Zellmorphologie und Kalziumsignal nahelegt, konnte aber nicht nachgewiesen werden. Daher ist anzunehmen, dass die Morphologie nicht oder zumindest nur in sehr geringem Umfang im Zusammenhang mit Kalzium-vermittelten Spermienfunktionen steht.

Shimizu et al. untersuchten bereits 2008 den Zusammenhang der Morphologie und der Änderung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration nach Stimulation mit humaner Follikelflüssigkeit, die unter anderem auch Progesteron enthält. Der prozentuale Anstieg der intrazellulären Kalziumionenkonzentration über die Basallinie war bei den morphologisch abnormalen Spermien mit 39,2 % geringer als bei morphologisch normalen Spermien, die im Durchschnitt einen prozentualen Kalziumionenkonzentrationsanstieg von 61,6 % nach Stimulation zeigten. Vor allem Zellen mit Schwanz- und Mittelstückdefekten hatten dabei einen schwächeren Anstieg nach Stimulation (Shimizu et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde das Kalziumsignal nicht quantitativ ausgewertet und zwischen den verschiedenen Defektformen unterschieden, sodass sich die Ergebnisse dieser und Shimizus Arbeit nicht zwangsläufig widersprechen. Bei der rein qualitativen Auswertung, die sich aus physiologischen Überlegungen ableitet (Kapitel 5.1), konnte keine negative Wirkung der Morphologie auf die Kalziumsignale nachgewiesen werden. Inwieweit die Höhe der Kalziumionenkonzentrationsänderung von Bedeutung ist, ist unklar. Eine höhere Progesteronkonzentration kann auch einen höheren Kalziumanstieg bewirken (Strünker et al. 2011), andererseits konnte schon für geringste Progesteronkonzentrationen ein Effekt auf Spermien nachgewiesen werden (Harper et al. 2003). Möglicherweise ist also gar nicht die absolute Höhe des Signals von Bedeutung, sondern nur, ob ein bestimmter Schwellenwert überschritten werden kann.

Da morphologische Defekte allerdings sehr variabel sind, ist durchaus denkbar, dass spezielle strukturelle Auffälligkeiten mit einer gestörten Kalzium-Signaltransduktion einher gehen könnten. Auch wenn in dieser Arbeit nicht zwischen einzelnen morphologischen Pathologien unterschieden wurde, sind die Unterschiede der Kalziumsignale zwischen den Gruppen aber nur gering, sodass ein entscheidender Zusammenhang zwischen der Morphologie der Spermien und ihren Kalziumsignalen unwahrscheinlich ist.

5.2.2 Morphologie und Spermienfunktionen

Mehrfach wurde versucht, die Morphologie mit Spermienfunktionen und -dysfunktionen zu assoziieren. So wurde unter anderem ein Einfluss der Morphologie auf die Zona-Pellucida-Bindung und die Akrosomreaktion beschrieben (Kruger und Coetzee 1999). Franken findet außerdem einen positiven Zusammenhang zwischen Morphologie und progressiver Motilität (Franken 2014). Die Morphologie hängt anscheinend mit einigen Spermienparametern zusammen. Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen aber, dass die Morphologie einer Zelle nicht mit den Progesteron-induzierten Kalziumsignalen korreliert und somit viele wichtige Spermienfunktionen unbeeinflusst bleiben müssten. Ob die Morphologie über andere Mechanismen einen negativen Einfluss auf die Spermien ausübt, wurde in diesen Experimenten nicht untersucht und kann daher nicht ausgeschlossen werden.

Die Rolle der Morphologie für die Fertilität ist in der Literatur umstritten (Ghirelli-Filho et al. 2012). So wurde in einigen neueren Arbeiten gezeigt, dass der morphologische Befund keine Rolle für den Erfolg einer künstlichen Befruchtung spielt (French et al. 2010, Ghirelli-Filho et al. 2012, Hotaling et al. 2011). Gerade wenn ohnehin eine intrazytoplasmatische Spermieninjektion im Rahmen einer Kinderwunschbehandlung geplant ist, verlieren viele Spermienfunktionen an Bedeutung. In diesen Fällen sollte der Nutzen einer routinemäßigen Morphologiebestimmung kritisch hinterfragt werden, da sich keine Konsequenzen für das weitere Vorgehen ergeben.

Die zentrale Aufgabe eines Spermiums ist der Transport des Erbguts zur weiblichen Gamete. Alle Spermienfunktionen dienen daher dem Erreichen dieses Ziel. DNA-Defekte sicher zu erkennen, wäre von großer Bedeutung in der Reproduktionsmedizin. Morphologische Auffälligkeiten, vor allem Kopfdefekte, werden in diesem Rahmen oft mit einer Schädigung des Erbgutes assoziiert (Utsuno et al. 2013). Eine aktuelle Studie zeigte, dass morphologisch auffällige Spermien öfter nicht-kondensiertes Chromatin aufwiesen als morphologisch unauffällige. Jedoch konnte auch nachgewiesen werden, dass sich nicht-kondensiertes Chromatin auch in morphologisch normalen Spermien finden lässt (Boitrelle et al. 2014). Ein augenscheinlich „normales Spermium“ ist also kein Garant für eine intakte DNA. Daher ist die Morphologie alleine ungeeignet um Rückschlüsse über den Zustand des Erbguts zu ziehen. Es wäre zukünftig interessant zu überprüfen, ob DNA-Defekte mit Veränderungen im

Kalziumsignal einher gehen. Möglicherweise ist das intrazelluläre Kalzium ein zuverlässigerer Indikator für DNA-Schäden als die Morphologie.

5.2.3 Zusammenfassung

Die Morphologiebestimmung ist als einfacher und kostengünstiger Parameter Bestandteil eines routinemäßig durchgeführten Spermioграмms. In den letzten Jahren wird ihre Bedeutung allerdings zunehmend in Frage gestellt. Diese Studie zeigt, dass die Morphologie keinen Einfluss auf die Konfiguration der Kalziumsignale nimmt. Damit sollten Kalzium-vermittelte Spermienfunktionen nicht von der Spermienmorphologie abhängen. Weitere Untersuchungen mit größerer Stichprobe und quantitativer Beurteilung der Kalziumsignale wären nötig, um die Relevanz der Morphologie abschließend zu beurteilen. Gerade im Rahmen einer künstlichen Befruchtung ist aber die Bedeutung des morphologischen Befunds vermutlich gering.

5.3 Ulipristal und Kalziumsignale

Da Ulipristal an den intrazellulären Progesteronrezeptor bindet (Richardson und Maltz 2012), könnte der Wirkstoff aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften auch den nicht-genomischen Progesteronrezeptor des Spermiums stimulieren und damit zu einer Veränderung des intrazellulären Kalziums führen. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Wirkung von Ulipristal auf die intrazelluläre Kalziumionenkonzentration humaner Spermien und seine Interaktion mit dem natürlichen Gestagen Progesteron untersucht.

5.3.1 Ulipristal und Kalzium

Ein Ulipristal-induzierter Kalziumeinstrom ließ sich bei einer Wirkstoffkonzentration von 20 μM beobachten. Niedrigere Konzentrationen führten nicht zu diesem Anstieg. Anscheinend ist die Wirkung von Ulipristal konzentrationsabhängig, somit bewirkt erst eine hohe Dosis am Rezeptor einen Progesteron-ähnlichen Kalziumeinstrom. Für Progesteron ist ein dosisabhängiger Kalziumanstieg bereits in der Literatur beschrieben (Harper et al. 2003).

Um die Kalziumsignale nach Ulipristalstimulation mit den physiologischen Signalen durch Progesteron vergleichen zu können, wurde in der Auswertung erneut die Kategorisierung gemäß dem graphischen Verlauf genutzt (Abbildung 12). Ähnlich wie bei Progesteronstimulation zeigte sich ein rascher Kalziumanstieg und -abfall nach Substanzzugabe bei mehr als zwei Dritteln der untersuchten Zellen. Auch die Kategorien B bis D traten in entsprechender Dosierung ähnlich oft auf. Lediglich in Kategorie E zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Ulipristal- und Progesteronstimulation, da mehr Zellen gar nicht auf Ulipristalzugabe reagierten als in der Progesteronkontrollgruppe. Insgesamt ähnelt das Ulipristal-induzierte Kalziumsignal dem des Progesterons, auch wenn eine deutliche höhere Konzentration nötig war, um dieses zu erzielen. Der höhere Anteil an nicht-reaktiven Spermien bei Ulipristalstimulation spricht aber dafür, dass der synthetische Wirkstoff schlechter wirksam ist als die Muttersubstanz Progesteron. Möglicherweise ist dieser schwächere Effekt durch eine geringere Affinität zum nicht-genomischen Progesteronrezeptor des Spermiums zu erklären.

Im Rahmen der Notfallkontrazeption erfolgt die einmalige Gabe von 30 mg UPA, erhältlich unter dem Handelsnamen EllaOne (Li et al. 2014a). Pharmakokinetische Daten dieses Präparats geben einen Serumpeak von 176 ± 89 ng / ml ($0,37 \pm 0,19$ μ M) etwa eine Stunde nach Einnahme an (Ko et al. 2014). Da der Ulipristal-induzierte Kalziumeinstrom bei den Messungen dieser Studie erst bei einer Konzentration von 20 μ M nachweisbar war, ist die UPA-Konzentration, der die Spermien im Genitaltrakt der Frau ausgesetzt sind, vermutlich nicht ausreichend, um das Kalziumsignal in vivo zu beeinflussen.

Die Konzentrationen, die bei der Myombehandlung zur Anwendung kommen, sind sogar noch deutlich geringer: das zugelassene Präparat Esmya enthält 5 mg UPA (Pohl et al. 2014). Allerdings gibt es bisher keine Untersuchungen zur Höhe der UPA-Konzentrationen in Flüssigkeiten des weiblichen Genitaltrakts (Ko et al. 2014), so dass eine Beeinflussung der Spermien durch therapeutisch eingesetztes Ulipristal nicht sicher ausgeschlossen werden kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit widersprechen den Resultaten einer bisher veröffentlichten Studie, die keinen alleinigen Effekt von UPA auf das intrazelluläre Kalzium finden konnte (Ko et al. 2014). Die Studie testete ebenfalls verschiedene Konzentratio-

nen (0,04; 0,4; 4; 40 μM). Es erfolgte zwar keine Untersuchung mit einer Konzentration von 20 μM , für die in dieser Studie ein Effekt auf den Kalziumeinstrom nachgewiesen werden konnte, aber eigentlich sollte bei einer konzentrationsabhängigen Wirkung auch höhere Ulipristalkonzentrationen wirksam sein. Allerdings erfolgte in der Arbeit von Ko et al. die Kalziummessung nur zu zwei Zeitpunkten, vor und 15 s nach Zugabe der Substanz. Möglicherweise wurde durch diese Methode die schnelle Kalziumelevation nicht erfasst. Um Aussagen zur Dynamik von Kalziumsignalen zu treffen, sind Messungen zu zwei Zeitpunkten ungenügend und wenig aussagekräftig. In zukünftigen Untersuchungen sollte versucht werden, der Wirkung von Ulipristal auf den Kalziumhaushalt von Spermien weiter nachzugehen um seinen Einfluss auf Samenzellen abschließend beurteilen zu können. Dabei sollte einerseits eine kontinuierliche Fluoreszenzmessung erfolgen, um Aussagen über die Reaktionsdynamik zu treffen, andererseits müssten weitere Konzentrationen getestet werden, um eine mögliche dosisabhängige Ulipristalwirkung nachzuweisen.

5.3.2 Ulipristal und Progesteron

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Ulipristal den Progesteron-induzierten Kalziumeinstrom verändert. Um mögliche Wechselwirkungen aufzudecken, erfolgten Messungen mit simultaner und sequentieller Zugabe von Ulipristal und Progesteron.

Bei gleichzeitiger Zugabe beider Substanzen konnten keine Veränderungen im Vergleich zur alleinigen Ulipristal- und Progesteronstimulation nachgewiesen werden. So zeigte sich auch bei simultaner Stimulation bei knapp 67,9 % der Zellen ein normales Reaktionsmuster. Ein statistisch signifikanter Unterschied zu den durch Progesteron allein induzierten Kalziumsignalen konnte nicht gefunden werden. Inwieweit bei der gleichzeitigen Zugabe welche Substanz für welchen Anteil an der Induktion des Kalziumeinstroms verantwortlich gemacht werden kann, bleibt spekulativ. Da Ulipristal aber schwächer als Progesteron zu wirken scheint, ist anzunehmen, dass bei simultaner Stimulation vor allem Progesteron den Kalziumeinstrom induziert

Additive Effekte, die man nach den bisherigen Ergebnissen ebenfalls hätte erwarten können, zeigten sich nicht. Das erklärt sich vermutlich durch eine Limitierung des maximalen Kalziumeinstroms durch den Catsper-Kanal. Eine Progesteronkonzentra-

tion von 3 μM stimuliert den Kanal vermutlich bereits maximal. Um potentiell hemmende Effekte des Ulipristals nachzuweisen, wären weitere Untersuchungen mit größerer Stichprobe notwendig. Insgesamt unterstützen diese Resultate jedoch die Annahme, dass Ulipristal in einer Progesteron-ähnlichen Weise auf Spermien wirkt.

In drei weiteren Versuchen wurde untersucht, ob eine vorangehende Ulipristalgabe einen Effekt auf die nachfolgende Progesteronstimulation hat. In dieser sequentiellen Untersuchung konnte dargestellt werden, dass sich das Progesteronsignal verschlechtert, wenn Ulipristal zehn Minuten zuvor auf die Spermien einwirken konnte. Es zeigten sich dann signifikant mehr Zellen mit oszillierenden Graphen oder keiner Reaktion. Der Anteil der Zellen mit normaler Reaktion sank auf 52,2 %. Ko et al. fanden ebenfalls einen hemmenden Effekt von Ulipristal auf den Progesteron-induzierten Kalziumeinstrom und deuten dies als antagonistische Wirkung des Ulipristals (Ko et al. 2014). Wahrscheinlicher ist jedoch, dass Ulipristal, ähnlich wie für Progesteron bekannt (Harper et al. 2003), eine Toleranzentwicklung der Spermien bewirkt und eine mehrmalige Stimulation zu einer Abschwächung oder Auslöschung des Signals führt. In den durchgeführten Versuchen mit mehrfacher Progesteronzugabe konnte dieser für Progesteron aus der Literatur bekannte Effekt bestätigt werden. So könnte es sich bei der beobachteten Abschwächung des Progesteronsignals dementsprechend auch um eine durch Ulipristal ausgelöste abnehmende Sensitivität gegenüber Progesteron handeln.

Erneut bestätigt sich die Annahme, dass Ulipristal schwächer wirksam ist als Progesteron. Während bei der sequentiellen Ulipristal/Progesteron-Versuchen immerhin noch $52,2 \% \pm 11,0 \%$ der Zellen in adäquater Weise reagierten, sind es bei den Progesteron/Progesteron-Versuchen nur $35 \% \pm 9,4 \%$. Die Desensibilisierung des Gestagenrezeptors tritt nach Ulipristalgabe somit in geringerem Umfang auf als durch das natürliche Gestagen.

Die Analyse der Amplitudenhöhe aus der sequentiellen Stimulation mit Ulipristal und Progesteron ergab, dass die Amplitude des Progesteronsignals in über 80 % der Fälle mindestens die Höhe des Ulipristalsignals aufwies oder es überragte. Die dazu untersuchten Fluoreszenzbilder zeigten ebenfalls eine erhöhte intrazelluläre Fluoreszenz bei Progesteronstimulation im Vergleich zur Ulipristalstimulation. Dies unter-

stützt weiterhin die These einer stärkeren Wirksamkeit und höheren Rezeptoraffinität des Progesterons.

Abschließend konnte gezeigt werden, dass Ulipristal in entsprechender Dosierung Kalziumsignale in Spermien induzieren, die Progesteron-ähnliche Eigenschaften aufweisen. Dass dieser Effekt tatsächlich über denselben Mechanismen vermittelt wird, ist aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit beider Substanzen und der ähnlichen Form der Kalziumsignale sehr wahrscheinlich.

5.3.3 Ulipristal und Spermienfunktionen

In dieser Studie wurde die Veränderung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration als Indikator für die Spermienfunktion gewählt. Andere Autoren haben bereits untersucht, wie sich Ulipristal auf verschiedene andere Spermienfunktionen auswirkt. Dabei konnte unabhängig von der eingesetzten Konzentration kein Effekt von Ulipristal auf Motilität, Überleben, DNA-Integrität, Kapazitation, spontane Akrosomreaktion und Hyperaktivität festgestellt werden (Ko et al. 2014, Munuce et al. 2012). Für die Progesteron-induzierte Akrosomreaktion fanden Ko et al. einen hemmenden Einfluss des Ulipristals (Ko et al. 2014). Dies entspricht den Beobachtungen dieser Studie, dass Ulipristal eine spätere Progesteronstimulation abschwächt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten keinen negativen Effekt auf die Kalziumsignale der Spermien nachweisen. Vielmehr zeigte sich eine dem physiologischen Spermienstimulator Progesteron ähnlicher Effekt auf die intrazelluläre Kalziumionenkonzentration. Das bestätigt die bisherigen Erkenntnisse, dass durch therapeutische Ulipristalanwendung kein negativer Effekt auf Spermienfunktionen zu erwarten ist.

5.3.4 Zusammenfassung

Für die therapeutische Anwendung von Ulipristal ist es von großer Bedeutung, die Wirkung der Substanz auf Spermien zu kennen, da diese im weiblichen Genitaltrakt diesem Gestagenabkömmling ausgesetzt sein könnten. Dazu wurde die Wirkung vom Ulipristal am nicht-genomischen Progesteronrezeptor der Samenzellen unter-

sucht. Bei Zugabe einer 20 μM Ulipristal-Lösung wurden Kalziumsignale beobachtet, die vergleichbar mit solchen nach Progesteronstimulation waren. Niedrigere Konzentrationen (5, 10, 15 μM) zeigten diese Signale nicht. Untersuchungen zur Interaktion mit Progesteron erfolgten durch Messungen mit simultaner und sequentieller Zugabe beider Substanzen. Hierbei konnte bei gleichzeitiger Zugabe der Wirkstoffe keine Veränderung der Progesteron-induzierten Kalziumsignale nachgewiesen werden, während eine vorangehende Ulipristalgabe einen hemmenden Effekt auf den nachfolgenden Progesteron-induzierten Kalziumanstieg hatte. Insgesamt zeigte Ulipristal eine dem natürlichen Gestagen ähnliche Wirkung.

5.4 Grenzen der Arbeit

Die Untersuchungen dieser Arbeit erfolgten mithilfe des Life-Cell-Imagings. Diese Methode bietet die Möglichkeit, einzelne Zellen beurteilen zu können, was für die Versuche zur Morphologie essentiell war. Allerdings bildet es nur einen winzigen Ausschnitt einer Samenprobe ab, da bei jeder Messung nur ein Bruchteil der Spermien analysiert werden kann. Desweiteren konnten mit diesem Verfahren nur Spermien ausgewertet werden, die ausreichend immobilisiert und an das Deckgläschen gebunden waren. Daher ist eine gewisse Selektion der Stichprobe nicht sicher auszuschließen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die einzelnen Zellen nur nach der Form ihres Graphen und nicht durch eine absolute Änderung ihres Fluoreszenzquotienten beurteilt. Es wurde zwar versucht, die ROIs so eng wie möglich um die Spermienzelle zu legen. Trotzdem unterschied sich die Größe der einzelnen ROIs und des mit erfassten Hintergrundes voneinander, sodass Vergleiche der absoluten Verhältnisse I_{340}/I_{380} bei der Auswertung nicht zulässig gewesen wären. Daher erfolgte in dieser Arbeit keine quantitative Auswertung der Signale. Die durchgeführte graphische Auswertung unterliegt zwar einer subjektiven Beurteilung, ist aber sinnvoll, da verschiedene Kalziumreaktionsmuster zu unterschiedlichen physiologischen Antworten führen könnten. Die Einteilung in die Kategorien wurde bewusst gewählt und aus bisherigen Erkenntnissen abgeleitet. Es ist aber nicht auszuschließen, dass sich in vivo andere Reaktionsmuster ausbilden und durch Reize der Umgebung komplexe Kalziumsig-

nale ergeben, die in vitro unentdeckt bleiben. Insofern ist die Übertragbarkeit der Erkenntnisse auf die tatsächlichen Verhältnisse im weiblichen Genitaltrakt begrenzt.

Möglicherweise stellen sich in der natürlichen Umgebung außerdem abweichende Substanzwirkungen dar, da andere Temperaturen und die physiologische Umgebung einen Einfluss auf die pharmakologischen Eigenschaften von Ulipristal und Progesteron haben könnten.

Für das Klassifizieren der Zellen gemäß ihrer morphologischen Konfiguration ist ein Durchlichtbild in 400-facher Vergrößerung verwendet worden. In dieser Vergrößerung wird meist routinemäßig der Morphologiebefund erhoben. Einige Bildausschnitte waren allerdings nur bedingt beurteilbar, da zum Teil Zellen in verschiedenen optischen Ebenen angeschnitten waren oder durch die Zellmotilität unscharfe Bereiche erzeugt wurden. Auch konnten spezielle morphologische Defekte wie kleine Vakuolen nur unzureichend beurteilt werden.

6 Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen verschiedener Faktoren – zum einen die morphologische Erscheinung, zum anderen die Wirkung von Ulipristal – auf die intrazelluläre Kalziumionenkonzentration von humanen Spermien untersucht.

Die Morphologiebestimmung galt lange als geeigneter Parameter zur Beurteilung des Fertilitätsvermögens in der andrologischen Diagnostik. In den letzten Jahren wird ihre Bedeutung allerdings zunehmend in Frage gestellt. Diese Arbeit zeigt, dass es keinen Zusammenhang zwischen der Morphologie eines Spermiums und seinen Kalziumsignalen gibt. Daher lässt sich schlussfolgern, dass die Morphologie für Kalziumvermittelte Spermienfunktionen keine Rolle spielt und so nicht zu einer verminderten Spermienfunktion führen kann. Natürlich könnte die Morphologie über andere Mechanismen zu einer verminderten Fertilität führen, aber gerade im Rahmen einer künstlichen Befruchtung ist die Erhebung des morphologischen Befundes von geringer Relevanz, da die klassischen Spermienfunktionen durch das Verfahren an Bedeutung verlieren.

Ulipristal kommt unter anderem in der Myomtherapie zum Einsatz. Dadurch könnten die Spermien mit dieser Substanz im weiblichen Genitaltrakt in Berührung kommen. Daher sollte in dieser Studie untersucht werden, ob Ulipristal neben seiner Wirkung am klassischen Progesteronrezeptor auch Effekte am nicht-genomischen Progesteronrezeptor der Spermien zeigt. Aus den Ergebnissen dieser Studie lässt sich schließen, dass Ulipristal erst in höheren Konzentrationen, die vermutlich durch orale Einnahme nicht erreicht werden, Einfluss auf den Kalziumeinstrom nimmt. Insgesamt zeigen Spermien nach Ulipristalgabe in entsprechender Dosierung jedoch ähnliche Kalziumsignale wie nach Progesteronstimulation. Bei Untersuchungen zur Interaktion von Ulipristal und Progesteron konnte bei gleichzeitiger Zugabe der Substanz keine Abschwächung des Signals beobachtet werden, während eine vorangehende Ulipristalgabe einen hemmenden Effekt auf das nachfolgende Progesteronsignal hatte. Dies legt nahe, dass Ulipristal ähnlich wie Progesteron zu einer Toleranzentwicklung bei mehrmaliger Stimulation führt. Insgesamt sprechen diese Ergebnisse für eine Wirkung von Ulipristal am nicht-genomischen Progesteronrezeptor der Spermien.

Die Untersuchung von Progesteron-induzierten Kalziumsignalen kann auch in der Infertilitätsdiagnostik genutzt werden. Manche Patienten bleiben trotz unauffälliger Diagnostik kinderlos. In solchen Fällen kämen unter anderem auch genetische Defekte im Kalzium-Messenger-System der Spermien als Ursache in Frage. Möglicherweise muss bei solchen Patienten trotz eines normalen Spermiogrammbefundes eine ICSI-Indikation gestellt werden.

Insgesamt ist die Untersuchung von Kalziumsignalen in Spermien von großer wissenschaftlicher Relevanz und liefert wertvolle Erkenntnisse für eine gezielte andrologische Diagnostik und Therapie.

Literaturverzeichnis

- Aumüller G. 2007. Anatomie: 208 Tabellen. Stuttgart: Thieme.
- Aziz N, Saleh RA, Sharma RK, Lewis-Jones I, Esfandiari N, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. 2004. Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertil Steril*, 81 (2):349-354.
- Baldi E, Luconi M, Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Forti G. 2009. Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: facts and fictions. *Molecular and cellular endocrinology*, 308 (1-2):39-46.
- Barratt CLR, Publicover SJ. 2012. Sperm are promiscuous and CatSper is to blame.... *The EMBO Journal*, 31 (7):1624-1626.
- Barratt CLR, Mansell S, Beaton C, Tardif S, Oxenham SK. 2010. Diagnostic tools in male infertility—the question of sperm dysfunction. *Asian Journal of Andrology*, 13 (1):53-58.
- Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosovsky A, Yagoda A, Lederman H, Artzi S, Gross M, Barak Y. 2003. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril*, 80 (6):1413-1419.
- Bedu-Addo K, Barratt CLR, Kirkman-Brown JC, Publicover SJ. 2007. Patterns of Ca²⁺(i) mobilization and cell response in human spermatozoa exposed to progesterone. *Developmental biology*, 302 (1):324-332.
- Boitrelle F, Pagnier M, Athiel Y, Swierkowski-Blanchard N, Torre A, Alter L, Muratorio C, Vialard F, Albert M, Selva J. 2014. A human morphologically normal spermatozoon may have noncondensed chromatin. *Andrologia*.
- Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. 2007. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human reproduction (Oxford, England)*, 22 (6):1506-1512.
- Brenker C, Goodwin N, Weyand I, Kashikar ND, Naruse M, Krähling M, Müller A, Kaupp UB, Strünker T. 2012. The CatSper channel: a polymodal chemosensor in human sperm. *The EMBO Journal*, 31 (7):1654-1665.
- Chabbert-Buffet N, Pintiaux A, Bouchard P. 2012. The imminent dawn of SPRMs in obstetrics and gynecology. *Molecular and cellular endocrinology*, 358 (2):232-243.
- Correia JN, Conner SJ, Kirkman-Brown JC. 2007. Non-genomic steroid actions in human spermatozoa. "Persistent tickling from a laden environment". *Seminars in reproductive medicine*, 25 (3):208-219.
- Darszon A, Nishigaki T, Beltran C, Trevino CL. 2011. Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa. *Physiological Reviews*, 91 (4):1305-1355.
- Demir B, Arikan, II, Bozdogan G, Esinler I, Karakoc Sokmensuer L, Gunalp S. 2012. Effect of sperm morphology on clinical outcome parameters in ICSI cycles. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 39 (2):144-146.
- Dittrich R, Maltaris T, Dragonas C, Huber C, Beckmann MW, Kiesewetter F. 2005. Individual assessment of sperm morphology of single spermatozoa used for intracytoplasmic sperm injection. *Andrologia*, 37 (1):53-56.
- Eisenbach M, Giojalas LC. 2006. Sperm guidance in mammals - an unpaved road to the egg. *Nature reviews*, 7 (4):276-285.
- Falsetti C, Baldi E, Krausz C, Casano R, Failli P, Forti G. 1993. Decreased responsiveness to progesterone of spermatozoa in oligozoospermic patients. *Journal of andrology*, 14 (1):17-22.
- Franken DR. 2014. How accurate is sperm morphology as an indicator of sperm function? *Andrologia*.
- Franken DR, Oehninger S. 2012. Semen analysis and sperm function testing. *Asian Journal of Andrology*, 14 (1):6-13.

- French DB, Sabanegh ES, Goldfarb J, Desai N. 2010. Does severe teratozoospermia affect blastocyst formation, live birth rate, and other clinical outcome parameters in ICSI cycles? *Fertility and sterility*, 93 (4):1097–1103.
- Ghirelli-Filho M, Mizrahi FE, Pompeo AC, Glina S. 2012. Influence of strict sperm morphology on the results of classic in vitro fertilization. *Int Braz J Urol*, 38 (4):519–528.
- Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY. 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry*, 260 (6):3440–3450.
- Harper CV, Barratt CLR, Publicover SJ. 2004. Stimulation of human spermatozoa with progesterone gradients to simulate approach to the oocyte. Induction of Ca^{2+} (i) oscillations and cyclical transitions in flagellar beating. *The Journal of biological chemistry*, 279 (44):46315–46325.
- Harper CV, Kirkman-Brown JC, Barratt CLR, Publicover SJ. 2003. Encoding of progesterone stimulus intensity by intracellular Ca^{2+} (Ca^{2+} i) in human spermatozoa. *The Biochemical journal*, 372 (Pt 2):407–417.
- Hayashi H, Miyata H. 1994. Fluorescence imaging of intracellular Ca^{2+} . *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 31 (1):1–10.
- Hildebrand MS, Avenarius MR, Fellous M, Zhang Y, Meyer NC, Auer J, Serres C, Kahrizi K, Najmabadi H, Beckmann JS, Smith RJH. 2010. Genetic male infertility and mutation of CATSPER ion channels. *European journal of human genetics : EJHG*, 18 (11):1178–1184.
- Ho HC, Suarez SS. 2003. Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biol Reprod*, 68 (5):1590–1596.
- Horak P, Mara M, Dundr P, Kubinova K, Kuzel D, Hudecek R, Chmel R. 2012. Effect of a selective progesterone receptor modulator on induction of apoptosis in uterine fibroids in vivo. *International journal of endocrinology*, 2012:436174.
- Hotaling JM, Smith JF, Rosen M, Muller CH, Walsh TJ. 2011. The relationship between isolated teratozoospermia and clinical pregnancy after in vitro fertilization with or without intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*, 95 (3):1141–1145.
- Jang S, Yi LSH. 2002. RU486 suppresses progesterone-induced acrosome reaction in boar spermatozoa. *Journal of biochemistry and molecular biology*, 35 (6):604–608.
- Keegan BR, Barton S, Sanchez X, Berkeley AS, Krey LC, Grifo J. 2007. Isolated teratozoospermia does not affect in vitro fertilization outcome and is not an indication for intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 88 (6):1583–1588.
- Kihaile PE, Misumi J, Hirotsuru K, Kumasako Y, Kisanga RE, Utsunomiya T. 2003. Comparison of sibling oocyte outcomes after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization in severe teratozoospermic patients in the first cycle. *Int J Androl*, 26 (1):57–62.
- Kirichok Y, Navarro B, Clapham DE. 2006. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca^{2+} channel. *Nature*, 439 (7077):737–740.
- Kirkman-Brown JC, Barratt CL, Publicover SJ. 2004. Slow calcium oscillations in human spermatozoa. *Biochem J*, 378 (Pt 3):827–832.
- Kirkman-Brown JC, Bray C, Stewart PM, Barratt CL, Publicover SJ. 2000. Biphasic elevation of $[\text{Ca}^{2+}]$ (i) in individual human spermatozoa exposed to progesterone. *Dev Biol*, 222 (2):326–335.
- Ko JK, Huang VW, Li RH, Yeung WS, Ho PC, Chiu PC. 2014. An in vitro study of the effect of mifepristone and ulipristal acetate on human sperm functions. *Andrology*, 2 (6):868–874.
- Krausz C, Bonaccorsi L, Maggio P, Luconi M, Criscuoli L, Fuzzi B, Pellegrini S, Forti G, Baldi E. 1996. Two functional assays of sperm responsiveness to progesterone and their predictive values in in-vitro fertilization. *Human reproduction (Oxford, England)*, 11 (8):1661–1667.
- Kruger TF, Coetzee K. 1999. The role of sperm morphology in assisted reproduction. *Hum Reprod Update*, 5 (2):172–178.
- Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. 1988. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 49 (1):112–117.

- Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, Smith K. 1986. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 46 (6):1118-1123.
- Leandri RD, Gachet A, Pfeffer J, Celebi C, Rives N, Carre-Pigeon F, Kulski O, Mitchell V, Parinaud J. 2013. Is intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) beneficial in the first ART cycle? a multicentric randomized controlled trial. *Andrology*, 1 (5):692-697.
- Li HW, Lo SS, Ho PC. 2014a. Emergency contraception. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 28 (6):835-844.
- Li LF, Xiang C, Zhu YB, Qin KR. 2014b. Modeling of progesterone-induced intracellular calcium signaling in human spermatozoa. *J Theor Biol*, 351:58-66.
- Lishko PV, Botchkina IL, Kirichok Y. 2011. Progesterone activates the principal Ca^{2+} channel of human sperm. *Nature*, 471 (7338):387-391.
- Liu DY, Baker HW. 1992. Morphology of spermatozoa bound to the zona pellucida of human oocytes that failed to fertilize in vitro. *J Reprod Fertil*, 94 (1):71-84.
- Lundin K, Soderlund B, Hamberger L. 1997. The relationship between sperm morphology and rates of fertilization, pregnancy and spontaneous abortion in an in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection programme. *Hum Reprod*, 12 (12):2676-2681.
- Munuce MJ, Zumoffen C, Cicare J, Caille A, Ghersevich S, Bahamondes L. 2012. Effect of exposure to ulipristal acetate on sperm function. *Eur J Contracept Reprod Health Care*, 17 (6):428-437.
- Muratori M, Luconi M, Marchiani S, Forti G, Baldi E. 2009. Molecular markers of human sperm functions. *International journal of andrology*, 32 (1):25-45.
- Nieschlag E, Bongers R. 2012. WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung und Aufarbeitung des menschlichen Ejakulates. 5 Aufl. Berlin: Springer.
- Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S, Hrsg. 2009. *Andrologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Osawa Y, Sueoka K, Iwata S, Shinohara M, Kobayashi N, Kuji N, Yoshimura Y. 1999. Assessment of the dominant abnormal form is useful for predicting the outcome of intracytoplasmic sperm injection in the case of severe teratozoospermia. *J Assist Reprod Genet*, 16 (8):436-442.
- Osman RA, Andria ML, Jones AD, Meizel S. 1989. Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun*, 160 (2):828-833.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. 1992. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 340 (8810):17-18.
- Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD. 2008. Chemical calcium indicators. *Methods (San Diego, Calif)*, 46 (3):143-151.
- Pohl O, Zobrist RH, Gotteland JP. 2014. The Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics of Ulipristal Acetate for the Treatment of Uterine Fibroids. *Reprod Sci*.
- Publicover S, Harper CV, Barratt C. 2007. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signalling in sperm--making the most of what you've got. *Nature cell biology*, 9 (3):235-242.
- Qi H, Moran MM, Navarro B, Chong JA, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Kirichok Y, Ramsey IS, Quill TA, Clapham DE. 2007. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (4):1219-1223.
- Reimann C-M. 2013. The comparison of two different freezing protocols and their influence on human sperm integrity [Master Thesis]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Ren D, Xia J. 2010. Calcium signaling through CatSper channels in mammalian fertilization. *Physiology (Bethesda, Md)*, 25 (3):165-175.
- Richardson AR, Maltz FN. 2012. Ulipristal acetate: review of the efficacy and safety of a newly approved agent for emergency contraception. *Clin Ther*, 34 (1):24-36.
- Sagare-Patil V, Galvankar M, Satiya M, Bhandari B, Gupta SK, Modi D. 2012. Differential concentration and time dependent effects of progesterone on kinase activity,

- hyperactivation and acrosome reaction in human spermatozoa. *International Journal of Andrology*:no.
- Serres C, Yang J, Jouannet P. 1994. RU486 and calcium fluxes in human spermatozoa. *Biochemical and biophysical research communications*, 204 (3):1009–1015.
- Shimizu Y, Minaguchi R, Ishikawa T, Harada T, Yoshiki N, Kubota T. 2008. Increase in the concentration of cytosolic-free calcium induced by human follicular fluid was decreased in single human spermatozoon with abnormal morphology. *Reproductive Medicine and Biology*, 7 (3):143-149.
- Singh AP, Rajender S. 2014. CatSper channel, sperm function and male fertility. *Reprod Biomed Online*.
- Singh SS, Belland L. 2015. Contemporary management of uterine fibroids: focus on emerging medical treatments. *Curr Med Res Opin*, 31 (1):1-12.
- Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. 2001. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod*, 16 (5):972-978.
- Strünker T, Goodwin N, Brenker C, Kashikar ND, Weyand I, Seifert R, Kaupp UB. 2011. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca^{2+} influx in human sperm. *Nature*, 471 (7338):382–386.
- Suarez SS, Pacey AA. 2006. Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update*, 12 (1):23-37.
- Tamburrino L, Marchiani S, Minetti F, Forti G, Muratori M, Baldi E. 2014. The CatSper calcium channel in human sperm: relation with motility and involvement in progesterone-induced acrosome reaction. *Hum Reprod*, 29 (3):418-428.
- Teves ME, Guidobaldi HA, Uñates DR, Sanchez R, Miska W, Publicover SJ, Morales Garcia AA, Giojalas LC, Hansen IA. 2009. Molecular Mechanism for Human Sperm Chemotaxis Mediated by Progesterone. *PLoS ONE*, 4 (12):e8211.
- Utsuno H, Oka K, Yamamoto A, Shiozawa T. 2013. Evaluation of sperm head shape at high magnification revealed correlation of sperm DNA fragmentation with aberrant head ellipticity and angularity. *Fertil Steril*, 99 (6):1573-1580.
- Wang C, Sinha-Hikim A, Leung A. 1995. The anti-progestin CDB 2914 has no antifertility effect in male rats. *Contraception*, 51 (3):215–218.
- Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES. 2001. A profile of fertilization in mammals. *Nature cell biology*, 3 (2):E59-64.
- WHO. 1992. WHO Laboratory Manual for the EXamination of Humen Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 3 Aufl. Cambridge: Cambridge University Press.
- WHO. 1999. WHO Laboratory Manual for the Examnination of Humen Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 4 Aufl. Cambridge: Cambridge University Press.
- WHO. 2010. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 5 Aufl. Cambridge: Cambridge University Press.
- Wilton JM. 2012. Ulipristal acetate: the newest emergency contraceptive. *Nursing for women's health*, 16 (4):331–335.
- Xia J, Ren D. 2009. The BSA-induced Ca^{2+} influx during sperm capacitation is CATSPER channel-dependent. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 7:119.
- Xia J, Reigada D, Mitchell CH, Ren D. 2007. CATSPER channel-mediated Ca^{2+} entry into mouse sperm triggers a tail-to-head propagation. *Biol Reprod*, 77 (3):551-559.
- Yang J, Serres C, Philibert D, Robel P, Baulieu EE, Jouannet P. 1994. Progesterone and RU486: opposing effects on human sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91 (2):529–533.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines Spermiums.....	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Prozesse im weiblichen Genitaltrakt.	8
Abbildung 3: Anregungsspektrum von Fura-2	10
Abbildung 4: Struktur des Catsper-Kanals.....	11
Abbildung 5: Strukturformel von Progesteron.	15
Abbildung 6: Biphasischer Kalziumeinstrom nach Progesteronstimulation.	16
Abbildung 7: Strukturformel von Ulipristalacetat.	18
Abbildung 8: Schematischer Versuchsaufbau.	24
Abbildung 9: Übersicht der durchgeführten Versuche.	27
Abbildung 10: Beispiel einer Fluoreszenzmessung.	29
Abbildung 11: Schematische Zeichnungen einiger abnormaler Spermien	31
Abbildung 12: Kategorien der Reaktionsmuster.....	34
Abbildung 13: Rascher Kalziumanstieg nach Progesteronstimulation.	35
Abbildung 14: Lichtmikroskopie der Spermien (400-fache Vergrößerung).	37
Abbildung 15: Zellmorphologie und Progesteronsignal.....	38
Abbildung 16: Verschiedene Reaktionen bei wiederholter Progesteronstimulation. ...	40
Abbildung 17: Vergleich von Ulipristal- und Progesteronstimulation.	42
Abbildung 18: Signale nach Ulipristal- und Progesteronzugabe.	43
Abbildung 19: Progesteronsignal nach Ulipristalzugabe.....	44
Abbildung 20: Vergleich der Amplitudenhöhe.....	46
Abbildung 21: Vergleich der Falschfarbenbilder.	46
Abbildung 22: Gleichzeitige Stimulation mit Ulipristal und Progesteron.	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Referenzwerte des normalen Spermiogramms gemäß der WHO	3
Tabelle 2: Kriterien eines normal geformten Spermiums	30
Tabelle 3: Kriterien eines abnormalen Spermiums	31
Tabelle 4: MW und SD von Konzentration und Motilität der Proben	32
Tabelle 5: Progesteronkontrolle.....	36
Tabelle 6: MW und SEM der morphologisch zugeteilten Gruppen.....	39
Tabelle 7: Wiederholte Progesteronzugabe.....	40
Tabelle 8: MW und SEM von Ulipristal- und Progesteronstimulation	42
Tabelle 9: Einfluss der Ulipristalvorbehandlung auf die Progesteronstimulation	45
Tabelle 10: MW und SEM bei simultaner Zugabe von Ulipristal und Progesteron	47

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Weiss, Dr. Hoppe sowie Prof. Dr. Biskup,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers

Danksagung

Viele Personen tragen zum Gelingen einer wissenschaftlichen Arbeit bei, deshalb möchte ich mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung der Dissertation unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt dabei Herrn Professor Dr. Weiss für die Betreuung meiner Arbeit, gute Fachgespräche sowie für viele wichtige thematische und wissenschaftliche Hinweise.

Desweiteren möchte ich mich bei Frau Dr. Hoppe bedanken, die nicht nur die Zusammenarbeit mit dem IVF-Labor ermöglichte, sondern immer ansprechbar war, wenn während der Arbeit Fragen zur Methodik auftraten. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Frau Ebertus und Frau Lemke erwähnen, die mich bei der Probenaufbereitung unterstützten und stets hilfsbereit auf meine Probleme eingingen.

Für die Betreuung beim Kalzium-Imaging möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Biskup bedanken. Trotz eines straffen Terminplans fand er die Zeit, mir bei Versuchsaufbau und praktischer Durchführung beiseite zu stehen. Ebenso soll hier auch den Mitarbeitern des zentralen Forschungslabors für die nette Atmosphäre und die vielen wertvollen Hinweise gedankt werden.

Herzlich möchte ich mich auch bei Christina Reimann bedanken, die mich an ihren Erfahrungen teilhaben ließ und mich gut in die Methode des Calcium-Imagings einführte.

Nicht zuletzt gilt der Dank auch meiner Familie und meinen Freunden. Insbesondere meine Eltern und mein Verlobter unterstützten und motivierten mich in allen Phasen der Arbeit. Durch euch werde ich mich immer gerne an diese Zeit erinnern.